

**Vergleich der Real time-PCR und einer  
DNA strip-Technologie zur  
mikrobiologischen Untersuchung bei  
Parodontitis**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät der Friedrich-  
Schiller-Universität Jena

von Anna Maria Straube  
geboren am 19.03.1977 in Rostock

Gutachter:

1. Prof. Dr. W. Pfister
2. PD Dr. S. Eick
3. PD Dr. B. Sigusch

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. 05. 2011

## Abkürzungsverzeichnis

BOP	-	bleeding on probing
DGP	-	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
DGZMK	-	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
ELISA	-	enzyme-linked immunosorbent assay
HSP	-	Hitzeschockprotein
jpg	-	joint photographic experts group
LPS	-	Lipopolysaccharide
MM	-	Mastermix
MMP	-	Matrix-Metall-Proteinasen
PCR	-	Polymerasekettenreaktion, engl. Polymerase chain reaction
PNM	-	Primer-Nukleotid-Mix
PNML	-	polymorphkernig neutrophile Granulozyten
rDNA	-	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
S-Layer	-	Oberflächenschicht, engl. surface layer
SRP	-	scaling and root planning
TSBV	-	tryptic soy-serum bacitracin-vancomycin
UPT	-	Unterstützende Parodontitistherapie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	5
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b> .....	7
2.1	Definition und Klassifizierung der Parodontalerkrankungen .....	7
2.2	Klinische Diagnostik und Therapie.....	8
2.3	Ätiologie und Pathogenese.....	10
2.4	Parodontopathogene Bakterien .....	14
2.5	Mikrobiologische Diagnostik.....	20
<b>3.</b>	<b>Zielstellung</b> .....	23
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	24
4.1	Patienten.....	24
4.2	DNA-Extraktion aus den Plaqueproben.....	25
4.3	Molekulargenetisches kommerzielles Testsystem zur Bestimmung von parodontopathogenen Markerkeimen (micro-Ident® und micro-Ident®plus).....	26
4.4	Die Real time-PCR .....	32
4.5	Statistische Berechnung .....	38
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	39
5.1	Vergleich microIdent® /microIdent®(plus) und Real time-PCR .....	39
5.2	Beurteilung des Therapieerfolges .....	62
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	74
6.1	Methodik .....	74
6.2	Nukleinsäurebasierte Verfahren in der mikrobiologischen Diagnostik von Parodontalerkrankungen .....	76
<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerungen</b> .....	81
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	82
	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	94
	<b>Danksagung</b> .....	96
	<b>Lebenslauf</b> .....	97
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	98

## 1. Zusammenfassung

Die Pathogenese der Parodontitis wird durch die Interaktion der Bakterien mit den Wirtsfaktoren bestimmt. Bakterienspezies, deren Vorkommen mit parodontalen Erkrankungen im Zusammenhang gesehen werden, sind: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*. Darüber hinaus besitzen auch *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodens* und *Capnocytophaga* sp. eine besondere Bedeutung. Die mikrobiologische Diagnostik ist bei aggressiver Parodontitis, schwerer chronischer Parodontitis, bei fortschreitendem Attachmentverlust trotz Therapie und nach erfolgter Parodontitistherapie vor dem Einsetzen von Implantaten angezeigt. Nukleinsäurebasierte Verfahren stellen heute hierbei den Standard dar.

Ziel vorliegender Studie war der Vergleich eines kommerziell erhältlichen semiquantitativen Nachweisverfahrens auf der Basis der DNS-Streifen-Technologie (microIdent®) mit einer In house Real time Polymerasekettenreaktion.

Von 25 Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis wurden Proben subgingivaler Plaque zur Baseline sowie drei, sechs und zwölf Monate danach entnommen. Nach Extraktion der DNA wurden die *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium nodatum*, und *Capnocytophaga* species durch beide angewandten Methoden nachgewiesen und quantitativ bestimmt. Die durch die DNA-Streifen-Technik gelieferten Resultate wurden semiquantitativ analysiert und zusätzlich mittels Densitometrie quantifiziert.

Die microIdent®-Ergebnisse konnten quantifiziert werden. Diese korrelierten für die vier parodontopathogenen Hauptkeime *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* signifikant mit denen der In house Real time-PCR, so wurde im Falle von *Porphyromonas gingivalis* ein Korrelationswert nach Spearman von 0,74, im Falle von *Tannerella forsythia* von 0,69 und im Falle von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* von 0,68 erzielt. Der Anteil der Proben, die durch die eine Nachweismethode als hoch keimbelastet und durch die andere als negativ bewertet wurden, lag jeweils unter 2% bezogen auf die Gesamtzahl aller gewonnenen Proben. Beide Nachweisverfahren verdeutlichten den

Einfluss der Behandlung auf die Mikroflora, insbesondere wies die DNA-Streifen-Technik reduzierte Keimmengen bei erfolgreicher Parodontitistherapie nach.

Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Ergebnisse mit beiden Methoden wurde nicht erzielt, eine mögliche Ursache hierfür kann in der komplexen Zusammensetzung des Gingivafluids liegen. Die In house Real time-PCR stellt eine kostengünstige und nützliche Methode für größere Studien dar. Aufgrund der Störanfälligkeit der In house Real time-PCR empfiehlt sich von vornherein ein doppelter Probenansatz. Die semiquantitative Strip-Technologie kann insbesondere für die Diagnose, Therapieplanung- und Kontrolle in der zahnärztlichen Praxis empfohlen werden.

## **1. Einleitung**

### **2.1 Definition und Klassifizierung der Parodontalerkrankungen**

Die Parodontitis ist eine bakterielle Infektion, die alle Bestandteile des Parodonts betrifft. Es kommt zu Attachmentverlust und Taschenbildung. Mögliche Folge ist der Zahnverlust. Es werden eine chronische und eine aggressive Form mit verschiedenen Verlaufsformen und Schweregraden unterschieden.

Beim dritten World Workshop, der 1999 von der American Academy of Periodontology in Princeton abgehalten wurde, wurde folgende Klassifizierung der Parodontalerkrankungen festgelegt (Armitage 1999):

#### **Klassifizierung der Parodontalerkrankungen**

- I. Erkrankungen der Gingiva
  - A. Plaqueinduzierte Erkrankungen der Gingiva
  - B. Nichtplaqueinduzierte Gingivaläsionen
- II. Chronische Parodontitis
  - A. Lokalisiert
  - B. Generalisiert
- III. Aggressive Parodontitis
  - A. Lokalisiert
  - B. Generalisiert
- IV. Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen
- V. Nekrotisierende Parodontalerkrankungen
- VI. Abszess des Parodonts
- VII. Parodontitis assoziiert mit endodontischen Läsionen
- VIII. Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten

#### **Plaqueinduzierte Gingivitis**

Die meisten Gingividen und Parodontiden sind plaqueinduziert (Löe 1965). Das bedeutet, dass der Biofilm einerseits und die Abwehrleistung des befallenen Individuums andererseits

eine herausragende Rolle spielen. Eine Mischflora aus Streptokokken, Aktinomyzeten und anderen anaeroben, gramnegativen Stäbchen ist hier typisch. Die Bakterien dringen nicht in das Gewebe ein.

### **Chronische Parodontitis**

Die chronische Parodontitis ist die am häufigsten vorkommende Form beim Erwachsenen. Das Ausmaß der Zerstörung stimmt mit der Präsenz lokaler Faktoren wie Zahnstein, Speichel, Rauchen, Mundatmung, mukogingivale Probleme, Zahnstellungsanomalien und iatrogene Maßnahmen überein. Häufig besteht subgingivaler Zahnstein. Die Mikroflora ist unspezifisch. Die Progression der Erkrankung ist langsam bis moderat. Aber auch Perioden mit schneller Progression treten auf.

Die chronische Parodontitis kann mit systemischen Erkrankungen wie z. B. Diabetes mellitus oder HIV-Infektion assoziiert sein und dadurch modifiziert werden. Neben dem Rauchen kann Stress eine Rolle spielen (Torrungruang et al. 2009).

### **Aggressive Parodontitis**

Diese Form der Parodontitis befällt häufig Jugendliche und junge Erwachsene. Außer der Parodontitis erscheint der Patient meist gesund. Ihre schwerwiegenden Symptome sind rapider Attachmentverlust und schneller vertikaler Knochenabbau. Es besteht eine familiäre Häufung, und entgegen der Erwartung findet man bei diesem schweren Krankheitsbild gewöhnlich nur wenig Plaque. Weiterhin sind erhöhte Anteile von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und teilweise *Porphyromonas gingivalis* nachgewiesen worden. Es besteht eine Veränderung der phagozytierenden Zellen. Die aggressive Parodontitis manifestiert sich vorwiegend an den vorderen Incisivi und den ersten Molaren (American Academy of Periodontology-Research Science and Therapy Committee 2008-2009).

## **2.2 Klinische Diagnostik und Therapie**

Klinisch ist die Parodontitis durch Entzündung, Bluten auf Sondieren sowie Knochenverlust gekennzeichnet. Folgeerscheinungen sind Zahnlockerung, Zahnverlust durch Zahnlockerung, Zahnwanderung und Kippung, Pusentleerung aus der Zahnfleischtasche und der Taschenabszess. So ist die Taschensondierung die wichtigste Untersuchung zur Beurteilung des Parodonts. Sie dient der Bestimmung der Gewebeerstörung, der Blutungsneigung, der



Feststellung von Konkrementen in der Tasche, der Beurteilung von Restaurationen und der Diagnostik von freiliegenden Furkationen. Die Sondierung erfolgt mit einer an der Spitze abgerundeten Sonde, entlang der Längsachse des Zahnes an sechs Punkten. Hierbei gilt: Sondierungstiefe + Rezession = Attachmentverlust. Die Rezession ist der Abstand zwischen freier marginaler Gingiva und der Schmelzzementgrenze (Pihlstrom 2001).

## **Therapie**

Das primäre Ziel der Parodontitistherapie ist, die Infektion und damit das Voranschreiten der Erkrankung zu stoppen. Im Vordergrund steht die mechanisch-instrumentelle Therapie. In speziellen Fällen können Medikamente (Antibiotika) unterstützend wirken. Dabei ist der wichtigste Schritt die systematische Entfernung von supra- und subgingivaler Plaque und Zahnstein. Das bedeutet die mechanische Zerstörung des subgingivalen Biofilms. Die Parodontitistherapie ist angezeigt bei PSI Grad 3 und 4. Sie gliedert sich in *Initialtherapie* (1. Schritt), *Taschenelimination* (2. Schritt) und *Recall* (Linde et al. 1975).

Die Initialtherapie (1. Schritt) ist eine kausale Therapie, bei der alle supra- und subgingivalen Ablagerungen entfernt und ferngehalten werden. Außerdem wird der Patient zur Mundhygiene motiviert und instruiert. Ziel ist die entzündungsfreie Gingiva (Page 1993).

Im 2. Schritt erfolgt dann die verstärkte Wurzelglättung, bei der die Reste des infizierten Biofilms und infiziertes Zement entfernt werden. Das ermöglicht das bindegewebige Anhaften der Gingiva auf der Wurzeloberfläche im Sinne eines Reattachments (Ferryhough et al. 1983).

Ziel der systematischen Parodontitistherapie ist die Beseitigung der Infektion durch antiinfektiöse Therapie. Dieser Maßnahme kann sich nicht nur aus ästhetischen, sondern auch aus funktionellen und prophylaktischen Gründen eine chirurgische Korrektur und Rekonstruktion anschließen. Diese könnte zum Beispiel bei über 6 mm tiefen Taschen an Molaren angezeigt sein. Im Vordergrund steht auch hier die Taschenreduktion durch Infektionsbekämpfung. Die Anlage eines Zugangslappens – „access flap“ (z. B. Kirkland-Lappen oder modifizierter Widman-Lappen) kann die vollständige Instrumentierung eines für nichtchirurgisches Vorgehen allein unzugänglichen Bereichs ermöglichen. Bei schweren Parodontitisfällen kann eine adjuvante, medikamentöse Therapie das Ergebnis relevant

verbessern. (Ehmke et al. 2005) Die systemische Antibiose hat strenge Indikationen, wie aggressive Parodontitis, generalisierte, schwere chronische Parodontitis und Parodontitiden, die trotz vorausgegangener Therapie weiter stark voranschreiten. Vor Therapiebeginn sollte eine Keimbestimmung in der subgingivalen Plaque erfolgen, um die Leitkeime zu identifizieren. Folgende Antibiotika sind nach einer gemeinsamen Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK) und der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) geeignet: Amoxicillin, Metronidazol, Ciprofloxacin, Doxycyclin, Tetracyclin und Clindamycin (Beikler et al. 2003).

### **Erhaltungstherapie/ Recall / Unterstützende Parodontistherapie**

Durch eine geeignete Erhaltungstherapie lässt sich etwa die Hälfte der parodontitisbedingten Zahnverluste vermeiden. (Tonetti et al. 2000) Ziel ist die langfristige Stabilisierung des nach der primären Parodontaltherapie gewonnenen Reattachments und damit der Zahnerhalt. Durch die regelmäßige Entfernung supra- und subgingivaler Biofilme soll die Entzündung auf möglichst niedrigem Niveau gehalten werden, sodass es im Idealfall zu keinem weiteren parodontal bedingten Knochenabbau kommt (Ramfjord 1993).

## **2.3 Ätiologie und Pathogenese**

### **Risikofaktoren**

Die Pathogenese der Parodontitis wird durch die Interaktion der Bakterien mit den Wirtsfaktoren bestimmt. Die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PNML) stellen die erste Verteidigungslinie gegenüber den Bakterien dar. Nach dieser zellulären Immunantwort folgt bei persistierender Infektion die humorale Immunreaktion. Zwischen den Bakterien und der Wirtsabwehr besteht ein labiles Gleichgewicht. Die Plaquebildung und die Wirtsabwehr auf bakterielle Noxen werden durch zahlreiche Faktoren, sogenannte Risikofaktoren, beeinflusst und wirken somit indirekt als Entzündungsursache. Es gibt lokale und funktionelle Faktoren wie Zahnstein, Speichel, Rauchen, iatrogene Maßnahmen, Mundatmung, Food impaction, mukogingivale Probleme und Zahnstellungsanomalien. Dazu gibt es eine Reihe endogener Faktoren, wie das Alter (zunehmendes Risiko), Faktoren des hämatopoetischen Systems, Systemerkrankungen mit oraler Beteiligung, hormonelle

Faktoren, Stress (Roberts et al. 2002), Ernährung, Medikamente und genetische Faktoren (Tabeta et al. 2009).

### **Interaktion der Bakterien untereinander**

Die Zahnplaque stellt ein typisches Beispiel für einen bakteriellen Biofilm dar (Marsh u. Bradshaw 1995). Frühbesiedler sind Streptokokken (*Streptococcus sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*), die sich an Pellikelstrukturen der Zahnoberfläche anheften. Nach etwa 20-30 Bakterienlagen wird der Bakterienrasen in seinem Inneren durch Sauerstoffverbrauch anaerob. Bereits nach etwa 4-7 Tagen erfolgt schon die Nachfolgebesiedlung durch mikroaerophile Spezies und Anaerobier. Wesentliche Vertreter dieser überwiegend anaeroben Bakterienspezies sind *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, und *Eubacterium nodatum*. Es ist anzunehmen, dass zur Auslösung einer Entzündung mehrere Spezies in Komplexen zusammenarbeiten (Sokransky und Haffajee 2002).

Diese oben genannten Anaerobier produzieren eine Vielfalt von Substanzen, welche die Gewebsdestruktion einleiten und/oder aufrechterhalten. Der Biofilm besteht aus vielen, in eine Matrix eingebetteten mikrobiellen Gemeinschaften. Diese adhärieren untereinander und/oder an Oberflächen (z.B. Pellikel). Sie sind hoch strukturiert mit Kanälen und Zirkulationssystemen (Abb.1), (Kuboniwa et al. 2009).

Die Bakterien des Biofilms sind nicht etwa zufällig verteilt, sondern funktionell organisiert. Die Genexpression kann sich ändern, ebenso die Zell-zu Zell-Kommunikation und der Gentransfer.

So ein Biofilm kann mechanisch, nicht aber allein chemisch zerstört werden (Hagiwara et al. 1993).

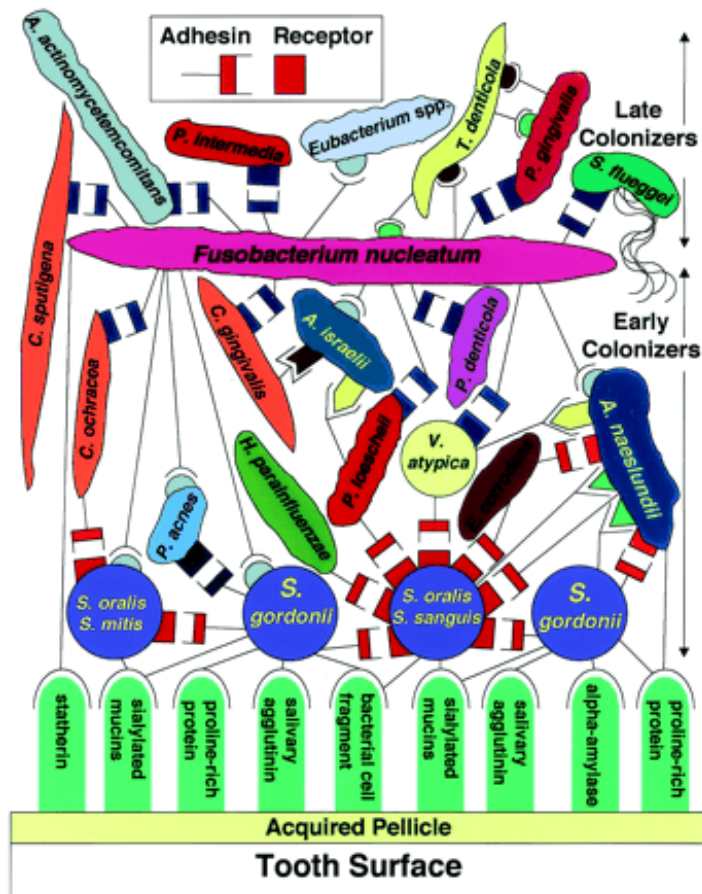


Abb. 1: Biofilm auf der Zahnoberfläche nach Kolenbrander et al. 2002

### Interaktion der Bakterien mit dem Wirt

Ein sich nicht mehr abschlüpfender mikrobieller Biofilm steht bei mangelnder mechanischer Mundhygiene in direktem Dauerkontakt zum Wirtsgewebe. Dadurch kann der Zahnbelag pathogenetische Bedeutung erlangen. Pathogene Bakterien verfügen über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, mit denen sie das parodontale Bindegewebe und den Knochen schädigen:

- Lipopolysaccharide werden beim Abbau gramnegativer Bakterien frei und wirken toxisch auf Granulozyten und Fibroblasten. Lipopolysaccharide fördern die Knochenresorption, führen zur Freisetzung von Matrix-Metallproteinase aus körpereigenen Zellen und besitzen wichtige Funktionen für die Antikörperbildung und die Komplementaktivierung (Potempa et al. 2009).
- Bakterielle Lipoteichonsäuren sind für die Resorption von Knochengewebe mitverantwortlich (Monefeldt 1989).

- Proteolytische Enzyme wie Kollagenasen, Phosphatasen, Phospholipasen, Hyaluronidasen und DNasen werden von vielen pathogenen Bakterien gebildet. Sie zerstören das Bindegewebe (Grenier 2006).
- Zytotoxische Stoffwechselprodukte wie organische Säuren, Schwefelwasserstoff, toxische Amine und Ammoniak führen zur entzündlichen Zerstörung des parodontalen Ligaments (Morita et al. 2001).

## Knochenabbau

Das Hauptkriterium der Parodontitis ist der entzündlich resorptive Verlust von Alveolarknochen und ligamentärem Faserapparat. Das wird als Attachmentverlust des Zahns bezeichnet. Mit dem schubweisen Verlust von Verbindungsepithel vertieft sich der Gingivasulkus und wandelt sich in eine Parodontaltasche (Knochentasche) um. Das Epithel ist mit T- und B-Lymphozyten und Plasmazellen infiltriert. Es ist durchlässig für Makromoleküle wie bakterielle Toxine und Enzyme. An der Knochenoberfläche entsteht eine hohe Osteoklastenaktivität, die zur Resorption führt. Ursache der Osteoklastenaktivierung sind die zahlreichen Zytokine, die von den Entzündungszellen freigesetzt werden (Cochan 2008). Der Kollagenabbau des supraalveolären und intraalveolären Faserapparates kann intrazellulär durch Fibroblasten erfolgen (Gängler et al. 2005). Der extrazelluläre Kollagenabbau geschieht u.a. durch lysosomale Enzyme der polymorphkernigen Leukozyten, die von vitalen PML während der Phagozytose freigesetzt werden (Bartold et al. 1984). Eine gute Gesamtübersicht dieser komplexen Vorgänge bietet die nachfolgende Abbildung (Abb. 2)

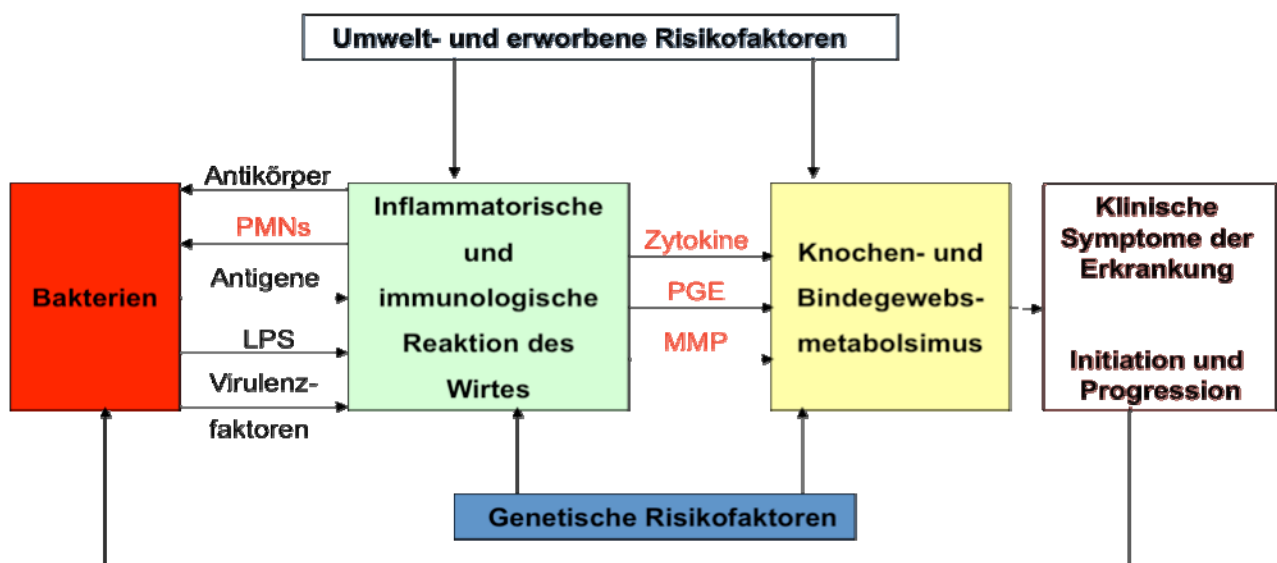


Abb. 2: Pathogenese der Parodontitis nach Page u. Kornman (1997)

## 2.4 Parodontopathogene Bakterien

Wichtige Schlüsselkeime parodontaler Erkrankungen sind:

- *A. actinomycetemcomitans*
- *P. gingivalis*
- *P. intermedia*
- *T. forsythia*
- *T. denticola*

Parodontopathogene Bakterien sind außerdem:

- *Parvimonas micra*
- *F. nucleatum*
- *C. rectus*
- *E. nodatum*
- *E. corrodens*
- *Capnocytophaga* sp.

### ***Aggregatibacter actinomycetemcomitans***

*A. actinomycetemcomitans* ist ein wichtiger Leitkeim der Parodontitis. Er wurde erstmals 1912 von Klinger als Begleitkeim der Aktinomykose beschrieben (*Bacterium actinomycetemcomitans*). Typischerweise tritt er bei schwerer, rekurrerender und aggressiver Parodontitis auf. Es gibt sechs Serotypen a, b, c, d, e und f (Paju et al. 2000). Die Typen a, b und c sind in der Mundhöhle am häufigsten vertreten, wobei klinische Isolate oft den Typ b (Yang et al. 2004) und gesunde Träger den Typ c aufweisen (Yang et al. 2005).

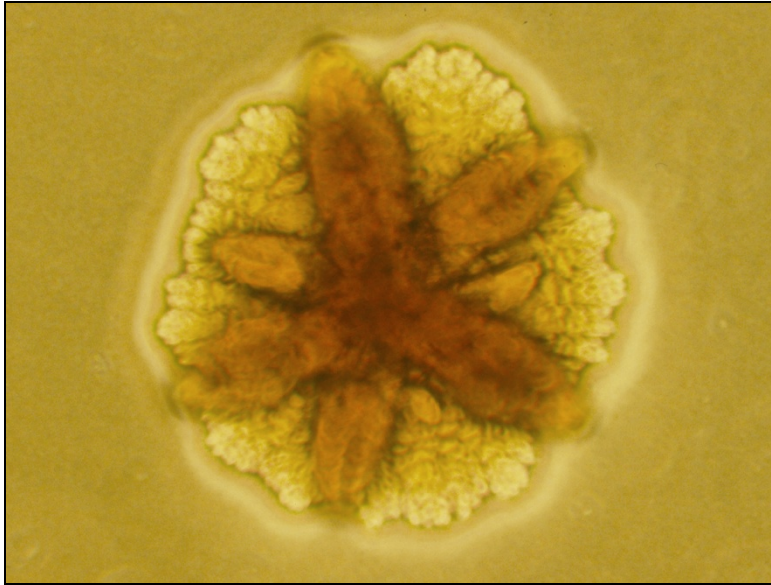


Abb. 3: Kolonie von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf TSBV-Agar

*A. actinomycetemcomitans* ist ein gramnegatives, kokkoides Stäbchen mit einer Größe von  $0,4 \times 1,0 \mu\text{m}$ . Er ist kapnophil und braucht 5 - 10%  $\text{CO}_2$  zum Wachstum.

*A. actinomycetemcomitans* ist nicht sporenbildend, unbeweglich und nicht hämolysierend. Weiterhin ist er katalase- und oxidase positiv. Stärke, Saccharose und Trehalose werden verstoffwechselt. Er kann nicht auf MacConkey-Agar wachsen, auf anderen Nährböden bildet er kleine, helle Kolonien mit einer „starlike inner structure“ (das Bild von gekreuzten Zigarren) und raue Oberflächen (Abb.3). Subkulturen sind glatte Kolonieförmungen durch den Verlust der Fimbrien (Antony et al. 2009).

Das Genom des *A. actinomycetemcomitans* wurde an der Universität von Oklahoma sequenziert und besteht aus 2 024 943 Basenpaaren. Seine DNA Sequenz entspricht zu 63% der des *Haemophilus influenzae*, der damit sein engster Verwandter ist (Wang et al. 2002).

Pathogene Bedeutung erlangt dieser Keim vor allem bei der lokalisierten, aggressiven Parodontitis, die hauptsächlich die Incisivi und ersten Molaren betrifft. In Deutschland und der EU sind 0,1- 2,3% der jungen Erwachsenen betroffen. Eine höhere Prävalenz liegt in der negroiden Bevölkerung der USA vor, und es wurde eine familiäre Häufung nachgewiesen (Slots 1999). Der Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* ist mit 97% der Proben aus erkrankten Sites signifikant häufiger als in gesunden Sites (Meng et al. 2009). Seine

Eradikation steht im Einklang mit einer Verbesserung des klinischen Befundes (Eickholz et al. 2001).

*A. actinomycetemcomitans* produziert ein Leukotoxin. Es wirkt zellspezifisch auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. So fördert es die neutrophile Degranulation über die Freisetzung von Metall-Matrix-Proteinasen MMP 8. Leukotoxin hemmt die Phagozytose und formt Poren in die Target-Zellen, was zur Zelllyse führt. Weiterhin wird die Apoptose der Zellen durch Aktivierung von Kaspasen induziert (Kelk et al. 2008).

*A. actinomycetemcomitans* adhärirt an Epithelzellen (Sliepen et al. 2008), Fibroblasten (Takahashi et al. 2008), speichelbenetztem Hydroxylapatit (Callan et al. 2005) und extrazellulärer Matrix (Mintz 1999, Fives-Taylor et al. 2000). Stämme mit Fimbrien adhäririeren stärker (Gutiérrez-Venegas 2007).

### ***Porphyromonas gingivalis***

*P. gingivalis* ist ein weiterer Leitkeim der schweren chronischen und teilweise der aggressiven Parodontitis.

*P. gingivalis* ist ein gramnegatives Stäbchen mit Kapsel und Fimbrien. Hämin und Vitamin K sind für sein Wachstum notwendig. Er wird durch infizierte Personen übertragen und besitzt Virulenzfaktoren wie Proteasen, Fimbrien, LPS und HSPs (Holt et al. 1999, Curtis et al. 1999).

Arginin- und lysin-spezifische Cysteinproteinasen von *P. gingivalis*, die sogenannten *Gingipaine* (Potempa et al. 2007) können

- Matrix-Metallproteinasen aktivieren (Andrian et al. 2007),
- Immunglobuline des Wirts, Komplement und Strukturproteine des Parodonts abbauen (Potempa et al. 2008),
- das Komplementsystem und das Kallikrein-Kinin-System aktivieren und so die Gefäßpermeabilität steigern (Imamura et al. 2004),
- Proteinaseinhibitoren des Wirts abbauen (Into et al. 2006).

Somit besitzen sie eine Schlüsselrolle bei der Gewebeschädigung (Potempa et al. 2000).

*P. gingivalis* adhärirt an epithelialen Zellen, Fibroblasten und Erythrozyten sowie an anderen Mikroorganismen, wie z. B. *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola*, die zusammen den „Roten Komplex“ bilden (Bodet et al. 2007).



### **Prevotella intermedia**

*P. intermedia* ist ein gramnegatives, anaerobes, kokkoides bis fadenförmiges Stäbchen, das in der physiologischen Körperflora des Menschen anzutreffen ist. Es kann mit anderen Bakterien der Mundhöhle wie *P. gingivalis* und *Actinomyces viscosus* koaggregieren. *P. intermedia* kommt physiologisch in der Vaginalflora vor, kann aber auch Atemwegsinfektionen, Pneumonie und Lungenabszesse und Osteomyelitis verursachen. Es kann ebenso Gingivitis und Parodontitis verursachen inklusive vertikalen Knochenverlusts. Es ist bekannt, dass *P. intermedia* zusammen mit *Porphyromonas gingivalis* polymikrobielle Infektionen verursachen (Kunkel 2009).

### **Tannerella forsythia**

Bei *T. forsythia* handelt sich um ein fusiformes, jedoch pleomorphes, unbewegliches, nicht pigmentiertes, saccharolytisches Bakterium. Zusammen mit *P. gingivalis* kann *T. forsythia* in das parodontale Gewebe eindringen. *T. forsythia* bildet folgende Virulenzfaktoren: Proteasen, Neuraminidasen, Faktoren, die bei Lymphozyten Apoptose auslösen, und toxische bzw. antigene Zellwandbestandteile in Form von Hitzeschockproteinen (Pei et. al 2009).

### **Treponema denticola**

*T. denticola* ist eine gramnegative, bewegliche, asaccharolytische, anaerobe Spirochäte, die zusammen mit *P. gingivalis* und *T. forsythia* ein bakterielles Konsortium bildet, das eng mit dem klinischen Voranschreiten der chronischen Parodontitis assoziiert ist (Veith et al. 2009).

Socransky und Haffajee wiesen 2002 auf das Zusammenwirken insbesondere dieser drei klinisch sehr bedeutsamen Spezies bei der Entstehung von parodontalen Erkrankungen hin, die sie als „roten Komplex“ bezeichnen.

### **Parvimonas micra**

Bei *P. micra* handelt es sich um grampositive, anaerobe Kokken, die aus der Mundhöhle isoliert wurden und oft in Zusammenhang mit polymikrobiellen Infektionen des Menschen gebracht werden (Ota-Tsuzuki et al 2009).

*P. micra* ist ein Kommensale in der Mundhöhle, wird aber bei Patienten mit Parodontitis häufiger und in höheren Keimzahlen isoliert (Swoboda et al. 2008). Weil der Keim ein potenter Produzent von zytotoxischen, flüchtigen Schwefelverbindungen ist, wird ein Zusammenhang zu parodontaler Destruktion hergestellt (Riggio et al. 2001).

### **Fusobacterium nucleatum**

Fusobakterien bilden eine Gattung gramnegativer obligater Anaerobier. Aus der Mundhöhle ist *F. nucleatum* am häufigsten isolierbar. *F. nucleatum* wird in großer Zahl in subgingivaler Plaque vorgefunden und ist ätiologisch mit parodontalen Entzündungen assoziiert, kann sich aber auch kommensal verhalten (Ikegami et al. 2009).

*F. nucleatum* koaggregiert mit fast allen anderen oralen Bakterienspezies und bildet somit bei der Reifung des Biofilms die wichtige Brücke zwischen Pionierkeimen und Nachfolgekeimen (Periasamy et al. 2009).

Da *F. nucleatum* an das Pellikelprotein Statherin binden kann, hat es bei der Biofilmbildung eine Schlüsselrolle inne. *F. nucleatum* bewirkt Hämagglutination, unterdrückt die T-Zell-Aktivierung und ist zytotoxisch. In seiner Zellwand wird das als Antigen und toxisch wirkende Hitzeschockprotein Hsp60 gefunden (Ford et al. 2006). Durch seine Entschwefelung von Aminosäuren wird Wasserstoffsulfid und Methylmercaptan in die Umgebung freigesetzt (Kang et al. 2006) und somit übler Mundgeruch (Liu et al 2009).

### **Campylobacter rectus**

*C. rectus* ist ein gramnegatives, mikroaerophiles Stäbchen, das im gingivalen Sulkus anzutreffen ist. Das Bakterium ist beweglich, hat eine Geißel und eine sogenannte Oberflächenschicht (S-Layer). Der Keim wurde mit der Parodontitis assoziiert und die S-Layer ist vermutlich der Grund für die Virulenz des Bakteriums. (Ihara et al. 2003) Das S-Layer-Protein kann die Bindung des Bakteriums an Epithelzellen fördern und den Keim gegen komplement-vermittelte Abtötung und gegen Phagozytose resistenter machen.

Außerdem besitzt *Campylobacter rectus* ein Hitzeschockprotein, welches die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Il-6 und Il-8 aus körpereigenen Zellen initiiert (Wang et al. 2000).

### ***Eubacterium nodatum***

*Eubacterium nodatum* ist ein nichtsporenbildendes, grampositives, nichtsaccharolytisches Stäbchen (Hill et al. 1987). *E. nodatum* wird vermehrt bei chronischer Parodontitis nachgewiesen (Haffajee et al. 2006).

### ***Eikenella corrodens***

*E. corrodens* ist ein pleomorphes, gramnegatives, kapnophiles Stäbchen, das die Agaroberfläche „korrodiert“ und in der Kultur einen typisch modrigen Geruch entfaltet. *E. corrodens* gehört zur Schleimhautflora und ist in der Mundhöhle, dem Respirationstrakt, dem Intestinaltrakt und dem Urogenitalbereich anzutreffen.

Mit *E. corrodens* assoziierte Abszesse, Wundinfektionen, Endokarditis, Meningitis und septische Arthritis wurden vor allem bei Patienten mit reduzierter Abwehrlage beschrieben (Pellachia et al. 2006).

### ***Capnocytophaga* spp.**

*Capnocytophaga* sind gramnegative Bakterien, die an beiden Enden spitz zulaufen. Sie sind nicht streng anaerob. Von medizinischem Interesse sind die Spezies *C. gingivalis*, *C. ochracea* und *C. sputigena*. Diese lassen sich vor allem aus der gesunden und kranken Mundhöhle, wie dem Sulkus, supra- und subgingivaler Plaque und Zahnfleischtaschen, isolieren. Ihre exakte ätiologische Rolle bei der Parodontitis ist noch nicht vollkommen geklärt, konnte aber tierexperimentell nachgewiesen werden. *Capnocytophaga* spp. sind bei Diabetespatienten mit Parodontitis eine dominierende Spezies im subgingivalen Biofilm (Ciantar et al. 2005).

## 2.5 Mikrobiologische Diagnostik

Die mikrobiologische Diagnostik ist bei aggressiver Parodontitis, schwerer chronischer Parodontitis, bei fortschreitendem Attachmentverlust trotz Therapie und nach erfolgter Parodontitistherapie vor dem Einsetzen von Implantaten angezeigt (Pye et al. 2009).

Dazu erfolgt eine Probeentnahme der subgingivalen Plaque. Zunächst wird die supragingivale Plaque entfernt und dann eine sterile endodontische Papierspitze bis zum Taschenfundus eingebracht. Sie verweilt dort 20-30 s und wird dann entnommen.

Der Versand erfolgt entweder trocken oder im Transportmedium, wenn eine Kultur erfolgen soll.

Folgende Möglichkeiten stehen prinzipiell zur Verfügung:

- Mikroskopie und Kultur,
- Nachweis bakterieller DNA,
- Nachweis bakterieller Enzyme,
- Nachweis bakterieller Antigene durch ELISA oder Immunofluoreszenz (Di Murro et al. 1997)

### Mikroskopie und Kultur

Es werden Nativpräparate und verlängert nach Gram gefärbte Präparate verwandt. Zu sehen ist die Zellmorphologie der in der Plaque vorkommenden Bakterien. Durch Mikroskopie sind z. B. Spirochäten (*Treponema denticola*) sichtbar, die kaum zu kultivieren sind (Fenno 2005).

Der kulturelle Nachweis ist routinemäßig für *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* und *E. corrodens* möglich. *T. forsythia* ist in der Kultur äußerst anspruchsvoll und *T. denticola* ist nur schwer kultivierbar. Nachteile der technisch anspruchsvollen konventionellen kulturellen Diagnostik sind Zeit- und Materialaufwand. Zur anaeroben und fakultativ anaeroben Kultivierung von Plaqueproben sind lebende Keime erforderlich. Die Diagnostik ist aufwendig und braucht einige Wochen bis zum endgültigen Ergebnis. Weitere Nachteile sind die geringe Sensitivität und die kritischen Versandbedingungen. Denn die Transportdauer sollte nicht mehr als 24 h betragen, um das

Überleben der empfindlichen Anaerobier nicht zu gefährden. Als Vorteil bietet die Kultur eine gute Übersicht über die in der Probe vorhandenen anzüchtbaren Keime.

Die Plaqueproben werden auf Nährmedien aufgebracht und bis zu 10 Tage bei 37°C unter strikt anaeroben Bedingungen inkubiert. Hiernach wird die Gesamtkeimzahl bestimmt.

Bakterienkolonien, die in ihrer Morphologie parodontalpathogenen Spezies entsprechen, werden auf Selektivmedien mit Hilfe biochemischer Tests endgültig identifiziert.

Das klassische Kulturverfahren wird heute angewendet, wenn sich mit den molekularbiologischen Tests keine Erreger nachweisen lassen oder wenn eine Resistenzbestimmung notwendig ist oder beispielsweise bei immunsupprimierten Patienten ein breites Keimspektrum erfasst werden soll (Jervøe-Storm et al. 2005).

### **Molekularbiologische Methoden – Nachweis bakterieller DNA**

Gentechnische Methoden werden inzwischen vermehrt zur Labordiagnose von parodontalen Erkrankungen (Infektionen) eingesetzt. Die DNA parodontalpathogener Keime, die sich nicht oder nur schwer kultivieren lassen oder aber nur sehr langsam wachsen, kann direkt durch eine auf der Polymerasekettenreaktion basierenden Technik nachgewiesen werden. Dieses Verfahren ist in der Zwischenzeit der Standard in der Diagnostik parodontopathogener Bakterien geworden (Eick et al. 2002, Pilstrom 2001).

#### *Polymerase-Kettenreaktion*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) als Methode des Nukleinsäurenachweises durch Amplifikationstechnik (selektiver Vervielfältigung einzelner DNA-Abschnitte) ist die sensitivste Nachweismethode für parodontale Markerkeime.

Grundlage ist die vielfache Wiederholung eines Teilschrittes, bei dem eine Kopie der beiden ursprünglichen DNA-Einzelstränge synthetisiert wird. In wenigen Stunden kann aus genetischem Material, das nur in wenigen Kopien vorhanden ist, ein spezifisches DNA-Fragment millionenfach angereichert und so der molekularbiologischen Analyse zugänglich gemacht werden. Die PCR ist schnell, hoch empfindlich und spezifisch.

Die Identifizierung des Amplifikats erfolgt über elektrophoretische Auftrennung oder durch Hybridisierungsmethoden (Haffajee et al. 2009).

Eine kostengünstige Variante bei Vorhandensein vieler zu bestimmender Proben ist die Real time-PCR (Ozbek et al. 2009). Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, die gesuchte

Nukleinsäure quantitativ erfassen zu können. Dabei wird das Ergebnis in Kopien pro Volumen angegeben.

### *Hybridisierung*

Unter molekularer Hybridisierung versteht man die paarige Zusammenlagerung zweier Nukleinsäure-Einzelstränge, die zueinander komplementäre Basenpaare besitzen, zu Doppelsträngen. Mit dieser Methode können DNA-Einzelstrangsequenzen mit komplementären, markierten Einzelsträngen (Gensonden) nachgewiesen werden. Diese Methode wird auch in einem kommerziellen Testsystem zum Nachweis von sechs parodontopathogenen Bakterien verwendet (Eick et al. 2002).

### 3. Zielstellung

Mikrobiologische Diagnostik besitzt im Rahmen der Parodontitisdiagnostik und Therapiekontrolle Bedeutung. Unterschiedliche Testverfahren und –systeme kommen hierbei zur Anwendung. Ziel dieser Studie war es zu ermitteln, wie hoch die Übereinstimmung zweier Verfahren zur Identifikation von parodontopathogenen Bakterien ist. Dabei sollte die Methode der Real time-PCR mit dem kommerziell erhältlichen microIdent®, bzw. microIdent® plus-Test der Firma Hain Lifescience, Nehren verglichen werden.

Beide Verfahren sollten bei Patienten mit chronischer Parodontitis im Rahmen der Diagnostik und Therapiekontrolle bis zu 12 Monaten nach Scaling und Root planing angewandt werden. Es sollte geklärt werden, ob oder in welchem Maße sich beide Verfahren auch zur Einschätzung des Therapieerfolges eignen.

Der microIdent® einschl. microIdent®plus-Test stellt ein semiquantitatives Verfahren dar. Die Auswertung der oben genannten Tests der Firma Hain Lifescience erfolgt durch die Beurteilung sichtbarer Banden auf einem Nitrozellulosestreifen, wobei die Stärke der Banden mit der Menge der nachweisbaren bakteriellen DNA korreliert. Im Rahmen dieser Studie sollte mittels Densitometrie die Stärke der Bande quantifiziert werden. Anhand dieser Quantifizierung der Banden sollte ein direkter Vergleich mit den Zahlen der DNA-Kopien der Real time-PCR möglich sein.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Patienten**

In diese Studie wurden subgingivale Plaqueproben aus parodontalen Taschen von 27 Patienten mit einer schweren chronischen Parodontitis einbezogen. Diese waren mindestens 25 Jahre alt und wiesen zumindest an fünf Zähnen Taschen mit einer Sondierungstiefe von  $\geq 5$  mm nach Initialtherapie auf. Weitere Einschlusskriterien waren mindestens 20 eigene Zähne, keine parodontalchirurgischen Maßnahmen während der letzten 24 Monate, keine schweren Allgemein- oder Stoffwechselerkrankungen, keine Schwangerschaft und Stillperiode, kein Antibiotikum in den letzten 6 Monaten. Auf eine einheitliche Verteilung von Rauchern und Nichtrauchern, bzw. von männlichen und weiblichen Personen wurde geachtet. Zusätzlich wurden zehn subgingivale Plaqueproben von fünf parodontal gesunden Probanden als Kontrollen in die Untersuchung einbezogen.

Die Initialtherapie beinhaltete die Entfernung des Zahnsteins (supragingival) in zwei Sitzungen. Anschließend erfolgte die Politur mit Gummikelch und rotierenden Interdentalbürstchen. Die Patienten mussten nach der Therapie einen Approximalraum-Plaqueindex  $< 30$  % aufweisen. Vor und nach Abschluss der Initialtherapie wurden bei allen in Frage kommenden Patienten folgende klinischen Parameter erfasst: Sondierungstiefe nach der Sechspunktmessung, Attachmentverlust und BOP. Zur Diagnostik wurde eine druckkalibrierte Sonde mit Millimeter-Skalierung verwendet.

Für die mikrobiologische Diagnostik wurden drei Taschen pro Kiefer mit einer Sondierungstiefe von  $\geq 5$  mm einbezogen. Die Taschen sollten, wenn möglich, zu einem Schneidezahn, einem Prämolaren und einem Molaren gehören. Zwei Papierspitzen wurden bis zum Fundus der Tasche eingeschoben und verblieben dort 30 s. Die Papierspitzen wurden bis zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion bei minus 20°C tiefgefroren.

Bei allen Patienten wurde einheitlich ein Scaling und Root planing durchgeführt. Zunächst spülten die Patienten 60 Sekunden mit 0,12%iger Chlorhexidinlösung ohne Alkoholzusatz. Das Scaling und Root planing erfolgte mit Handinstrumenten, bei mehrwurzligen Zähnen



kam zusätzlich Ultraschall zum Einsatz. Anschließend wurde mit physiologischer Natriumchloridlösung gespült.

Die klinischen und mikrobiologischen Parameter wurden wiederum drei, sechs und zwölf Monate nach Scaling und Root planing bestimmt (Tabelle 1). Die Vorgehensweise entsprach der des Baseline-Befunds. Drei und sechs Monate nach Scaling und Root planing erfolgte noch keine subgingivale Intervention, erst nach zwölf Monaten wurde diese je nach Erfordernis durchgeführt und entsprechend dokumentiert.

Tabelle 1

Anzahl der mikrobiologischen Proben zu den verschiedenen Entnahmezeitpunkten

Patienten (n)	Baseline	3 Monate nach SRP	6 Monate nach SRP	12 Monate nach SRP	Probenzahl (n)
19	57	57	57	57	228
8	24		24	24	72
27	81	57	81	81	300

Pro Patient wurden pro Zeitpunkt drei verschiedene Proben analysiert. Von acht Patienten fehlten die Proben zum Entnahmezeitpunkt 2, sodass diese nicht in der Auswertung berücksichtigt werden konnten.

## 4.2 DNA-Extraktion aus den Plaqueproben

Die Extraktion erfolgte mit dem Kit „Genomic Mini for universal genomic DNA isolation“ der Firma A&A BIOTECHNOLOGY, Gdynia, Polen.

Die DNA-Extraktion erfolgte modifiziert nach Firmenangaben wie folgt:

In jedes Probenröhrchen, in dem sich jeweils eine mit dem Sulkusfluid des Patienten durchtränkte Papierspitze befand, wurden 100 µl Tris-Puffer pipettiert, anschließend 30 s mit dem Vortexmixer gemischt und kurz anzentrifugiert. Daran schloss sich die Zugabe von 200 µl Total- Lysis- Puffer und 20 µl Proteinase K und 20 s Mischen mittels Vortexmixer an. Nun folgte eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C, danach eine fünfminütige Inkubation bei 70° C.

(Währenddessen wurden 500 µl Tris-Puffer in eine Eppendorf-Tube pipettiert und auf 75 °C vorgewärmt.) Jetzt wurde die Probe zwei Minuten lang bei 14 000 g zentrifugiert, anschließend der Durchlauf verworfen, das Filtrertube wieder in das Auffanggefäß gesetzt und 500 µl Waschpuffer hinzu pipettiert. Es folgte eine einminütige Zentrifugation mit 14 000 g. Das Auffanggefäß wurde verworfen, das Filtrertube in ein neues 2 ml Tube eingesetzt, 400 µl Waschpuffer hinzu pipettiert und anschließend zwei Minuten lang bei 14 000 g zentrifugiert. Wiederum wurde das Auffanggefäß verworfen und das Filtrertube in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Tube eingesetzt. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl, zuvor auf 75°C erhitzten, Tris-Puffers und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Abschließend wurde nochmals eine Minute bei 14 000 g zentrifugiert. Das Filtrertube wurde verworfen und das Reaktionsgefäß verschlossen.

Die erhaltenen DNA wurden zu je  $2 \times 2,5$  µl (für microIdent® und microIdent®plus) und zu je  $10 \times 2$  µl (für die Real time-PCR) aliquotiert und anschließend bei -20°C eingefroren.

#### **4.3 Molekulargenetisches kommerzielles Testsystem zur Bestimmung von parodontopathogenen Markerkeimen (micro-Ident® und micro-Ident®plus)**

Es wurden die Kits der Firma Hain Lifescience GmbH, 72147 Nehren, Deutschland verwendet.

##### *Methodik*

Der micro-Ident®-Test beruht auf der DNA STRIP®-Technologie und erlaubt die gemeinsame molekulargenetische Identifizierung der fünf parodontopathogenen Bakterien-Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola*.

Der micro-Ident®plus-Test beruht ebenfalls auf der DNA STRIP®-Technologie und erlaubt als Erweiterungstest zum micro-Ident®-Test die gemeinsame molekulargenetische Identifizierung der sechs parodontopathogenen Bakterienspezies *P. micra*, *F. nucleatum/periodonticum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens* und *Capnocytophaga* sp.(*C.gingivalis*, *C. ochracea* und *C. sputigena*).

Der gesamte Testablauf unterteilt sich in folgende drei Phasen:

- DNA-Extraktion aus den subgingivalen Plaqueproben wie oben beschrieben
- Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern
- Reverse Hybridisierung

#### *Bestandteile des Kits*

Ein micro-Ident® bzw. micro-Ident®plus-Kit enthielt die folgenden Bestandteile:

- Membranstreifen; beschichtet mit spezifischen Gensonden (STRIPS)
- Primer-Nukleotid-Mix (PNM); enthält spezifische Primer, Nukleotide, Farbstoff
- Denaturierungsreagenz (DEN) gebrauchsfertig; enthält <2% NaOH, Farbstoff
- Hybridisierungspuffer (HYB) gebrauchsfertig; enthält 8-10% anionisches Tensid, Farbstoff
- Stringent-Waschlösung (STR) gebrauchsfertig; enthält >25% einer quartären Ammoniumverbindung, <1% anionisches Tensid, Farbstoff
- Rinse-Lösung (RIN) gebrauchsfertig; enthält Puffersubstanz, <1% NaCl, <1% anionisches Tensid
- Konjugat-Konzentrat (CON-C) Konzentrat, enthält Streptavidin – konjugierte alkalische Phosphatase, Farbstoff
- Konjugat-Puffer (CON-D); enthält Puffersubstanz, 1% Blocking – Reagenz, <1% NaCl
- Substrat-Konzentrat (SUB-C) Konzentrat; enthält Dimethylsulfoxid, Substratlösung
- Substrat-Puffer (SUB-D); enthält Puffersubstanz, <1% MgCl<sub>2</sub>, <1% NaCl
- Inkubationswanne, Auswertungsbogen
- Arbeitsanleitung, Schablone.

#### *Durchführung der PCR für den microIdent® und micro-Ident®plus-Kit*

In der Regel wurden für die PCR zwölf Proben auf einmal angesetzt. Nachfolgend wird der Ansatz eines Mastermix für eine Probe und für zwölf Proben (einschl. Pipettierverlust) beschrieben (Tabelle 2).

Tabelle 2

Ansatz des Mastermix für eine Probe und zwölf Proben der PCR des microIdents®

MM 1 Probe	MM 12 Proben
17,5 µl PMN	227,5 µl PMN
2,5 µl Puffer	32,5 µl Puffer
2,5 µl MgCl <sub>2</sub>	32,5 µl MgCl <sub>2</sub>
1 U taq-Polymerase	13 U taq-Polymerase
Je 22,5 µl MM + 2,5 µl DNA	Je 22,5 µl MM +2,5 µl DNA

MM – Mastermix

PMN – Primer-Nukleotid-Mix, enthält spezifische Primer, Nukleotide, Farbstoff

Es wurde taq-Polymerase mit dazugehörigem MgCl<sub>2</sub> und Puffer der Firma MBI Fermentas, Vilnius, Litauen verwendet.

Diese Proben wurden zur Amplifikation in den „Mastercycler gradient S“ der Firma Eppendorf Hamburg gegeben, der auf folgendes Programm eingestellt wurde:

5 min	95°C	1 Zyklus
30 s	95°C	10 Zyklen
2 min	58°C	
25 s	95°C	20 Zyklen
40 s	53°C	
40 s	70°C	
8 min	70°C	

Hierdurch wurde nun die DNA der beim Patienten vermuteten parodontopathogenen Keime durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt.

### *Ablauf der Hybridisierung*

Für die sich anschließende Hybridisierung wurde zunächst das Wasserbad auf 45°C vorgeheizt und darin die benötigte Menge an Hybridisierungspuffer und Stringent-Waschlösung erwärmt. Danach wurden die entsprechende Menge an Konjugatlösung (10µl CON-C + 1 ml CON-D/Probe) und an Substratlösung (10µl SUB-C + 1 ml SUB-D/ Probe) angesetzt und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Rinse-Lösung wurde ebenfalls dem Kühlschrank entnommen und auf Raumtemperatur erwärmt.

Nun wurde in jede einzelne Wannenkavität pro Probe 20 µl des Denaturierungsreagenz gegeben. Hierzu erfolgte die Zugabe je 20 µl Amplifikats, welches nun gut mit dem Denaturierungsreagenz vermischt wurde und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Inzwischen wurden die Membranstreifen (strips) mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Plastikröhrchen genommen und sehr vorsichtig mit Bleistift als Orientierungshilfe durchnummeriert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml des vorgewärmten Hybridisierungspuffers, und die Streifen wurden mit einer Pinzette in die Kavitäten der Wanne gelegt. Die beladene Wanne wurde für 30 Minuten in einem Schüttelwasserbad bei 45°C inkubiert.

Dann wurde der Hybridisierungspuffer vollständig entfernt. Jetzt wurde jeweils 1 ml der vorgewärmten Stringent-Waschlösung zugegeben. Das Waschen erfolgte unter leichtem Schütteln 15 min bei ebenfalls 45°C im Wasserbad.

Danach wurde ausschließlich bei Raumtemperatur gearbeitet. Zunächst wurde die Stringent-Waschlösung vollständig entfernt. Anschließend wurden die Flüssigkeitsreste durch Abklopfen der Wanne auf einer saugfähigen Unterlage (Saugpapier) entfernt. Dies galt auch für alle folgenden Waschschrte. Die Membranstreifen wurden nun einmal eine Minute lang mit 1 ml Rinse-Lösung unter stetiger Bewegung auf dem Horizontalschüttler gewaschen und die Rinse-Lösung danach abgeschüttet.

Nun erfolgte die Zugabe 1 ml verdünnten Konjugats zu jedem Membranstreifen und die 30-minütige Inkubation auf dem Horizontalschüttler. Die Lösung wurde wiederum entfernt und

die Membranstreifen zweimal eine Minute lang mit destilliertem Wasser auf dem Schüttler gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift war das Wasser möglichst vollständig zu entfernen. Nun wurde jeweils 1 ml verdünntes Substrat zu jedem Membranstreifen gegeben und lichtgeschützt inkubiert. Die Substratinkubationszeit konnte abhängig von den Testbedingungen z. B. der Raumtemperatur zwischen drei und 20 Minuten variieren. Nach deutlichem Sichtbarwerden der Banden wurde die Substratreaktion durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser abgebrochen. Die Membranstreifen wurden nun mit einer Pinzette aus der Kavität genommen und getrocknet und anschließend auf die Auswertebögen mit Tesafilm am Rand aufgeklebt.

### *Auswertung*

Die Auswertung erfolgte mittels einer mitgelieferten Schablone (Abb. ...).

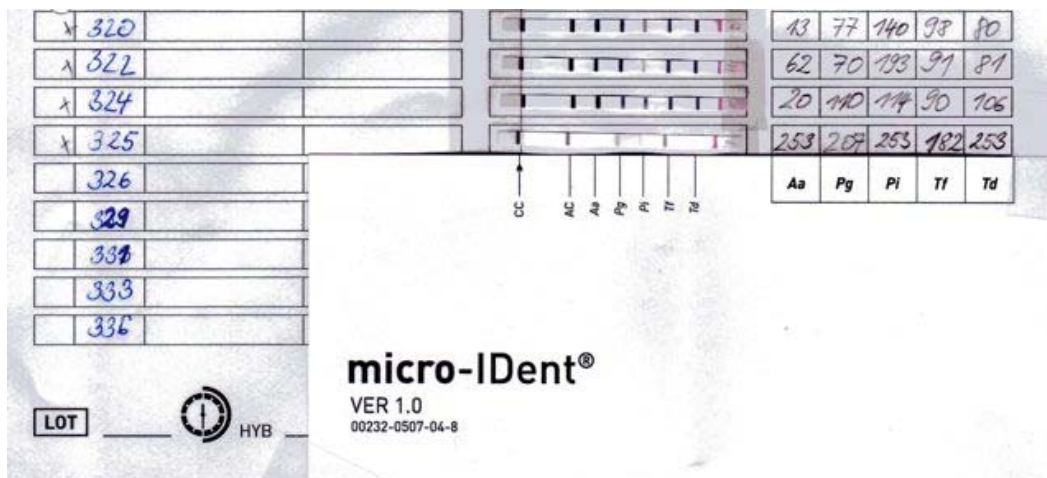


Abb.4: Ausschnitt aus micro-IDent®-Auswertungsbogen mit angelegter Schablone

### *Densitometrie mit Photoshop® Elements*

Die Membranstreifen wurden im Sinne einer Densitometrie mit dem Programm Photoshop® Elements ausgewertet.

Dazu wurden zunächst die DIN A4 Blätter mit den aufgeklebten Membranstreifen gescannt. Hier wurde nun ein guter Kontrast eingestellt. Jeweils vier Membranstreifen wurden in ein jpg

Bild gespeichert. Die darin gemessenen Helligkeiten (Luminanz) wurden in eine zuvor erstellte und ausgedruckte Tabelle per Hand eingetragen.

Der nach der letzten Waschung weitestgehend ungefärbte Hintergrund eines Streifens wurde der Negativkontrolle gleichgesetzt und die dunkelgefärbte Konjugatskontrolle CC der Positivkontrolle. Die Helligkeitsspanne zwischen der jeweiligen Negativkontrolle (heller Hintergrund) und Positivkontrolle (CC) wurde gleich 100% gesetzt. Die jeweils unterschiedlich stark angefärbte Bande eines Streifens wurde zu diesen 100% Prozent in Relation gesetzt. Jede angefärbte Bande gehört zu einer Bakterienspezies. Ihre Intensität wurde zur jeweiligen Positivkontrolle gemessen (Tabelle 3).

Tabelle 3

Beispielproben mit Werten aus der Densitometriemessung (Die gemessenen Werte sind dimensionslos.)

Pro- be	Neg. - tiv- Kon.	Pos.Kon.	Ampl.Kon.	A. act.	P. ging.	P. interm.	T. fors.	T. dent. Icla
320	251	11	7	13	77	140	98	80
322	249	2	19	62	70	193	91	81
324	249	8	3	20	110	114	90	106
325	253	39	127	253	207	253	182	253

(Neg.Kon – Negativkontrolle Konjugat, Pos.Kon – Positivkontrolle, Ampl.Kon – Amplifikationskontrolle, A.act. – A. actinomycetemcomitans, P. ging. – P. gingivalis, P. interm. – P. intermedia, T. fors. – T. forsythia, T. dent. – T. denticola)

Beispiel der Probe 320 für die Bande der Spezies A. actinomycetemcomitans:

$$251(\text{Neg. Kon.}) - 11 (\text{Pos. Kon.}) = 240$$

$$240 = 100 \%$$

$$13 = 5,42 \%$$

Erklärung:

- 251 ist der gemessene, dimensionslose Wert der Negativkontrolle.

- 240 ist der errechnete, dimensionslose Wert der Helligkeitsspanne, der zwischen der gemessenen Negativkontrolle und der gemessenen Positivkontrolle liegt und durch Subtraktion ermittelt wurde und dann gleich 100% gesetzt wurde.
- 13 ist der gemessene, dimensionslose Wert der Bande A. actinomycescomitans.
- über den Dreisatz kann die Luminanz der Bande A. actinomycescomitans in Prozent angegeben werden.

Beispiel der Probe 325 für die Bande der Spezies P. gingivalis:

$$253 \text{ (Neg. Kon.)} - 39 \text{ (Pos. Kon.)} = 214$$

$$214 = 100 \%$$

$$207 = 96,73 \%$$

Erklärung

- 253 ist der gemessene, dimensionslose Wert der Negativkontrolle.
- 214 ist der errechnete, dimensionslose Wert der Helligkeitsspanne zwischen der gemessenen Negativkontrolle und der gemessenen Positivkontrolle, der durch Subtraktion ermittelt wurde und gleich 100 % gesetzt wurde.
- 207 ist der gemessene, dimensionslose Wert der Bande P. gingivalis.
- Über den Dreisatz kann die Luminanz der Bande P. gingivalis in Prozent angegeben werden.

#### 4.4 Die Real time-PCR

Die Real time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs, der aus mehreren Zyklen besteht, wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR, die wenige Zyklen in einem Lauf



dauert, ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen, z.B. SYBR Green.

Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein, bzw. binden an sie. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt.

### Schmelzkurvenanalyse

Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Abb. 5), anhand derer die Fragmentlänge und dadurch die Spezifität bestimmt werden kann. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur erhöht wird (50 °C → 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff (z. B. SYBR Green) freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

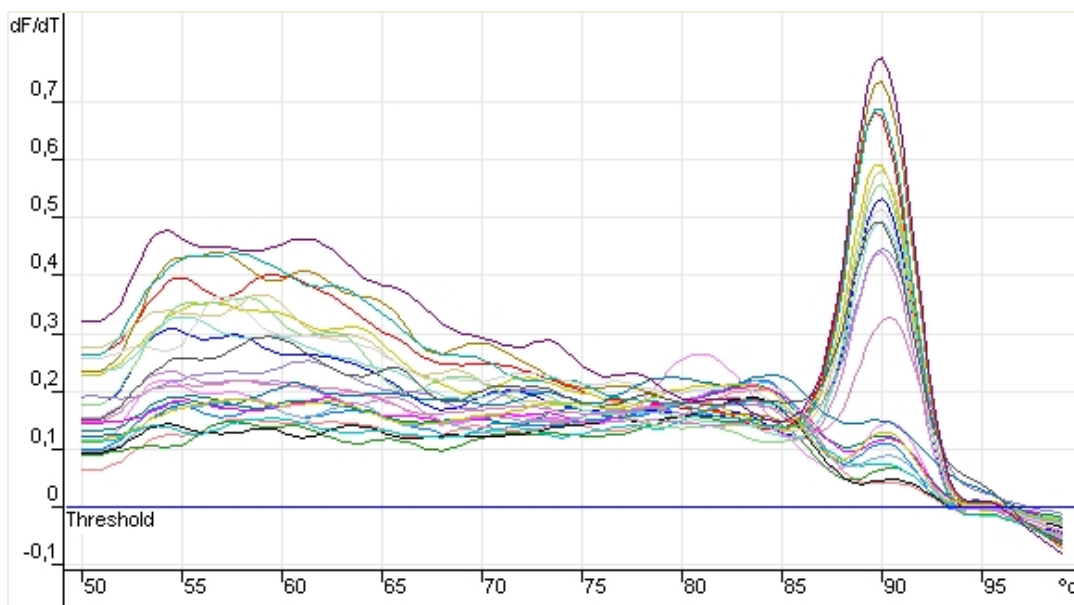


Abb. 5: Während der PCR aufgezeichnetes Fluoreszenzsignal und anschließende Schmelzkurve des Produktes

Für die Real time-PCR wurde ebenfalls ein Master-Mix hergestellt (Tabelle 4).

Hier wurden Puffer,  $\text{MgCl}_2$ , Nukleotide, taq-Polymerase, SYBR Green und die jeweiligen speziesspezifischen Primer pipettiert.

Ansatz des Master-Mix für die Real time-PCR

Tabelle 4:

Mastermix einer Probe und 36er Proben

1 Probe	36 Proben
2 $\mu\text{l}$ 10fach Puffer	78 $\mu\text{l}$ Puffer
2,2 $\mu\text{l}$ $\text{MgCl}_2$	84 $\mu\text{l}$ $\text{MgCl}_2$ (25mM)
2 $\mu\text{l}$ Nukleotide	78 $\mu\text{l}$ Nukleotide
1 $\mu\text{l}$ Primer 1	39 $\mu\text{l}$ Primer 1
1 $\mu\text{l}$ Primer 2	39 $\mu\text{l}$ Primer 2
1 $\mu\text{l}$ SYBR Green	39 $\mu\text{l}$ SYBR Green (1:500)
1 $\mu\text{l}$ taq-Polymerase	39 $\mu\text{l}$ taq-Polymerase
8 $\mu\text{l}$ $\text{dH}_2\text{O}$	312 $\mu\text{l}$ $\text{dH}_2\text{O}$
Je 18 $\mu\text{l}$ + 2 $\mu\text{l}$ DNA	Je 18 $\mu\text{l}$ + 2 $\mu\text{l}$ DNA

Die Proben wurden in den Rotorgene 2000 der Firma Corbett Research, Sydney, Australien gegeben (Tabelle 5).

Tabelle 5:

Arbeitsablauf

Denaturierung	94 °C	5 min
Cycling	94°C	20 s
	x °C	20 s
	72 °C	25 s
Halten	40 °C	120 s
	50 °C	60 s

Starttemperatur	50 °C
Endtemperatur	99 °C

x Annealingtemperatur

Die Annealingtemperatur liegt immer 1-2°C unter der Schmelztemperatur der Primer (Tabelle 6)

Tabelle 6:

Verwendete Annealing-Temperaturen:

Primer	Pg	Aa	Tf	Pi	Sc	Fn	Cr	Eubact	Spiro	Td
Annealing Temperatur	60°	58°C	60°C	55°C	57°C	60°C	60°C	60°C	60°C	60°C

Für die Real time-PCR wurden die folgenden Primer verwendet:

#### *Primer parodontopathogener Bakterien*

*P. gingivalis* (Ashimoto et al. 1996):

- Pg-1: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG
- Pg-2: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT

*T. forsythia* (Ashimoto et al. 1996):

- Tf-1: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA
- Tf-2: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T

*T. denticola* (Ashimoto et al. 1996):

- Td-1: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T
- Td-2: TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA

*A. actinomycetemcomitans* (Tran & Rudney 1999)

- Aa-1: ATT GGG GTT TAG CCC TGG TG
- Aa-2: ACG TCA TCC CCA CCT TCC TC

*P. intermedia* (Ashimoto et al. 1996):

- Pi-1: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG
- Pi-2: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T

*C. rectus* (Ashimoto et al. 1996):

- Cr-1: TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC
- Cr-2: TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT

*E. corrodens* (Ashimoto et al. 1996):

- Ec-1: CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G
- Ec-2: CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C

*E. nodatum* (Cheeseman et al 1996)

- En-1: TTA AGT AAG CGT AGG GTT TAA GG
- En-2: AAT TAA ACC ACA TGC TCC GC

*P. micra* (Song et al. 2003)

- Pm-1: AAC CGA CGA TTA ATA CCG CAT GAG ACC
- Pm-2: CTT CCT CCT ATG ATA CCG TCA TTA

*F. nucleatum* (Fouad et al. 2002)

- Fn-1: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
- Fn-2: GTC ATC GTG CAC ACA GAA TTG CTG

*Capnocytophaga* sp. (Hayashi et al. 2001)

- C-1: AGA GTT GAT CCT GGC TCA G

*C. sputigena*

- Cs-2: AGT AAG AGT TTG ATC CTG GC (Vandamme et al. 1993)

*C. ochracea*

- Co-2: GAT GCC GTC ACA CTA CTA TAC TA (Vandamme et al. 1996)



C. gingivalis

- Cg-2: CAT CTT TCA CCA CCG CAG TT (Kook et al. 2002)

#### **4.5 Statistische Berechnung**

Die statistische Berechnung wurde mit dem Programm SPSS 15.0 durchgeführt.

Zum einen wurden Korrelationen analysiert. Hier wurde der Korrelationskoeffizient R nach Spearman berechnet.

Zum anderen erfolgte ein Vergleich der Keimzahlen zu den einzelnen Zeitpunkten während der Therapie. Zwischen den Gruppen erfolgte der Vergleich mit dem Mann-Whitney-Test.

Innerhalb der Gruppen wurden die Veränderungen zwischen den Zeitpunkten zu den Zeitpunkten t1- Baseline, t2- 3 Monate nach SRP, t3- 6 Monate nach SRP und t4- 12 Monate nach SRP zwischen den beiden Vergleichsgruppen mit und ohne Therapieerfolg erhoben.

P - Signifikanz

0,001 - höchste Signifikanz

0,01 - mittlere Signifikanz

0,05 - niedrige Signifikanz

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Vergleich microIdent® /microIdent®(plus) und Real time-PCR

Die nach Anwendung der Densitometrie ermittelten Zahlenwerte für die Menge der Bakterien im microIdent®/microIdent®plus-Test wurden mit den durch Real time-PCR ermittelten DNA Kopienzahlen der entsprechenden parodontopathogenen Keime verglichen und in Relation gesetzt (Tabelle 7).

Tabelle 7:

Korrelation zwischen microIdent®(plus) und Real time-PCR

	Spearman R	Signifikanz p
A .actinomycetemcomitans	0,68	<0,001
P. gingivalis	0,74	<0,001
P. intermedia	0,64	<0,001
T. forsythia	0,69	<0,001
T.denticola	0,62	<0,001
P.micra	0,53	<0,001
F. nucleatum	0,59	<0,001
C.rectus	0,63	<0,001
E. corrodens	0,59	<0,001
E. nodatum	0,59	<0,001
Capnocytophaga sp.	0,33	<0,001

R - Korrelationskoeffizient

P - Signifikanz

Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen beiden Nachweismethoden. Die größte Übereinstimmung gab es bei der Spezies P. gingivalis, die niedrigste bei Capnocytophaga species.

In den nachfolgenden Ausführungen erfolgt der Vergleich der durch die beiden beschriebenen Verfahren nachgewiesenen Keimmengen gesondert für die einzelnen parodontopathogenen Spezies. Dabei findet sich in den Abbildungen ein direkter Vergleich der ermittelten Zahlenwerte, die für die jeweiligen Keimzahlen stehen (quantitativer Vergleich).

Demgegenüber wird für die Darstellung in den Tabellen eine semiquantitative Darstellung dieser Werte gewählt. Dazu erfolgte die Einteilung der Luminanzwerte im microIdent®/microIdent®plus-Test in vier Stufen sowie die der Keimzahlen der Real time-PCR in fünf Stufen (Tabelle 8).

Tabelle 8:  
Stufen bei semiquantitativer Auswertung

<b>Stufe</b>	<b>microIdent® (plus)</b> (Luminanzwerte)	<b>Real-time</b> (Keimzahlen)
0	0,00	1 (kein Nachweis)
1	0,01 – 9,99	2 - 999
2	10 – 39,99	1 000 – 9 999
3	40 – 69,99	10 000 – 99 999
4	≥ 70,00	100 000 – 999 999
5		≥ 1 000 000

In den nachfolgenden Abbildungen sind jeweils auf der Abszisse die mit der Real time-PCR ermittelten DNA-Kopien in logarithmischer Darstellung zu sehen. Auf der Ordinate sind die Werte der Densitometrie angegeben, die sich auf den microIdent®/microIdent®plus-Test beziehen.



Aggregatibacter actinomycetemcomitans

*Quantitativer Vergleich*

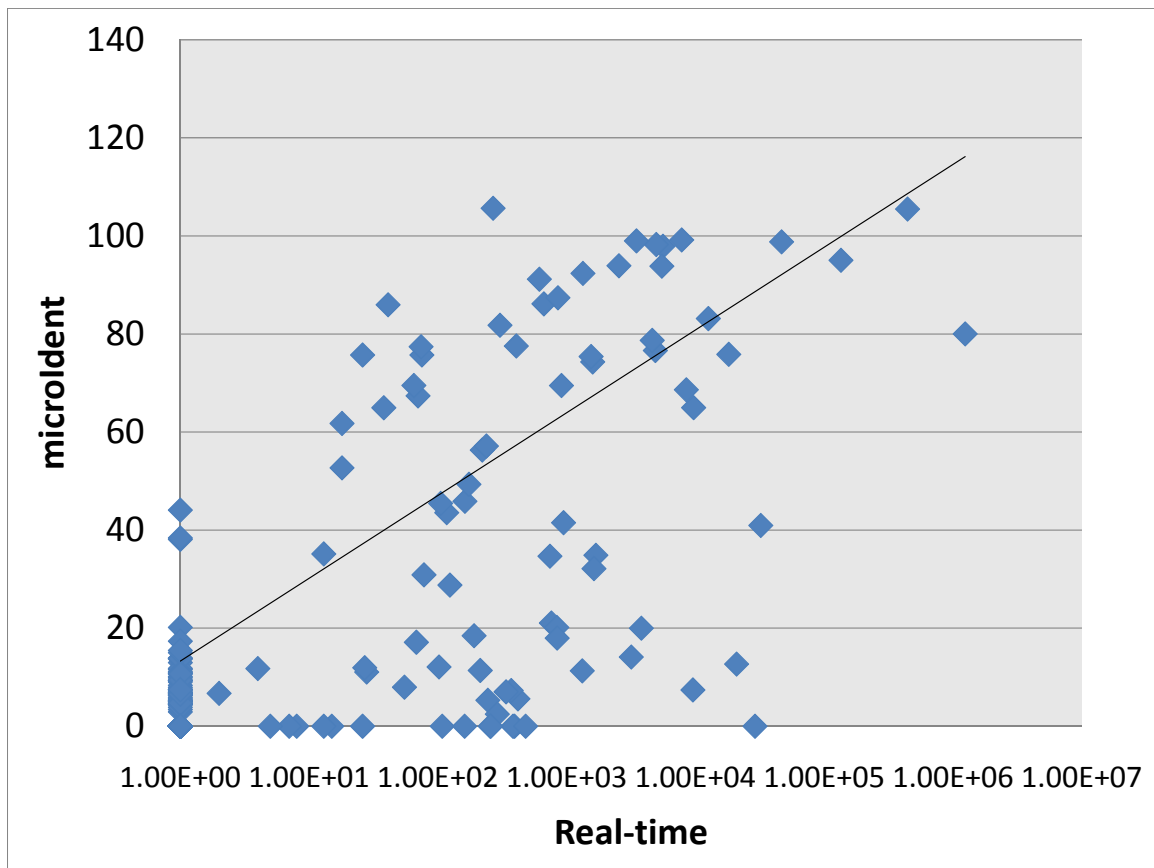


Abb. 6: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Bei dem Keim *A. actinomycetemcomitans* ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden deutlich zu erkennen. Der Korrelationswert R nach Spearman betrug 0,68; ( $p < 0,001$ ).

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 9:

Kreuzdiagramm für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®

A.a.		microIdent®					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-	0	170	35	17	1	0	223
time	1	13	7	14	13	10	57
	2	0	1	5	2	11	19
	3	1	0	1	1	3	6
	4	0	0	0	0	2	2
	5	0	0	0	0	1	1
Gesamt		184	43	37	17	27	308

Eine gute Übereinstimmung der semiquantitativen Werte lässt sich auch im Kreuzdiagramm ablesen. Nur eine von 308 Proben (0,33%) war bei der Real time-PCR in deutlich höherer Quantität vorhanden, während elf Proben (3,57%) beim microIdent®-Test ein deutlicheres Signal als bei der Real-time gaben.

Porphyromonas gingivalis

*Quantitativer Vergleich*

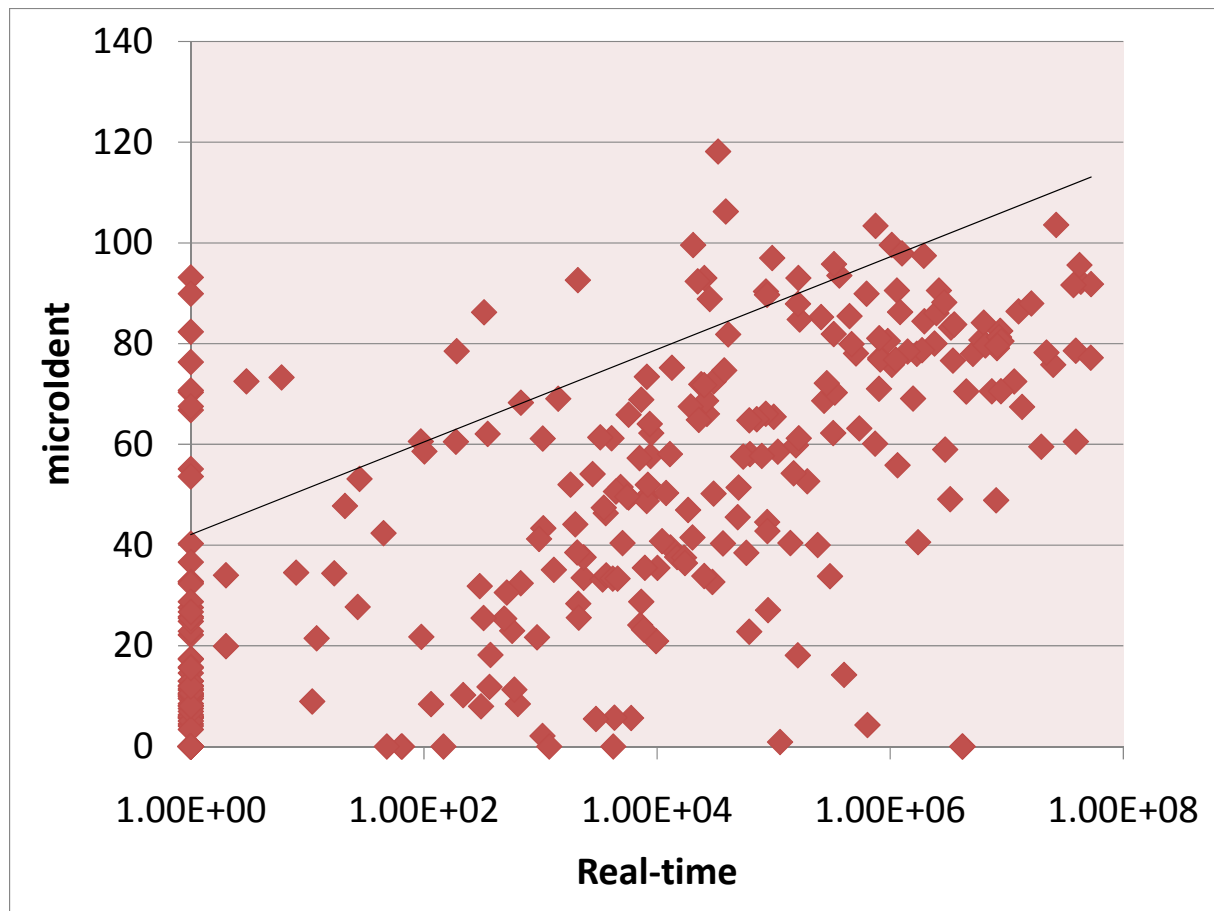


Abb. 7: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Porphyromonas gingivalis*

Deutlich ist auch eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *P. gingivalis* zu erkennen. Der Korrelationswert nach Spearman betrug 0,74; ( $p < 0,001$ ).

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 10:

Kreuzdiagramm für *Porphyromonas gingivalis* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®

P.g.		microIdent®					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-time	0	35	15	26	5	6	87
	1	4	4	18	9	4	39
	2	2	4	15	24	2	47
	3	0	0	10	21	15	46
	4	0	2	3	12	19	36
	5	2	0	0	9	42	53
Gesamt		43	25	72	80	88	308

Bei dem semiquantitativen Vergleich lässt sich ebenso eine gute Übereinstimmung ablesen. 15 Proben (4,87 %) ergaben beim microIdent®-Test ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR. Vier Proben (1,30 %) wiesen bei der Real time-PCR deutlich höhere Werte als beim microIdent®-Test auf.

## Prevotella intermedia

### *Quantitativer Vergleich*

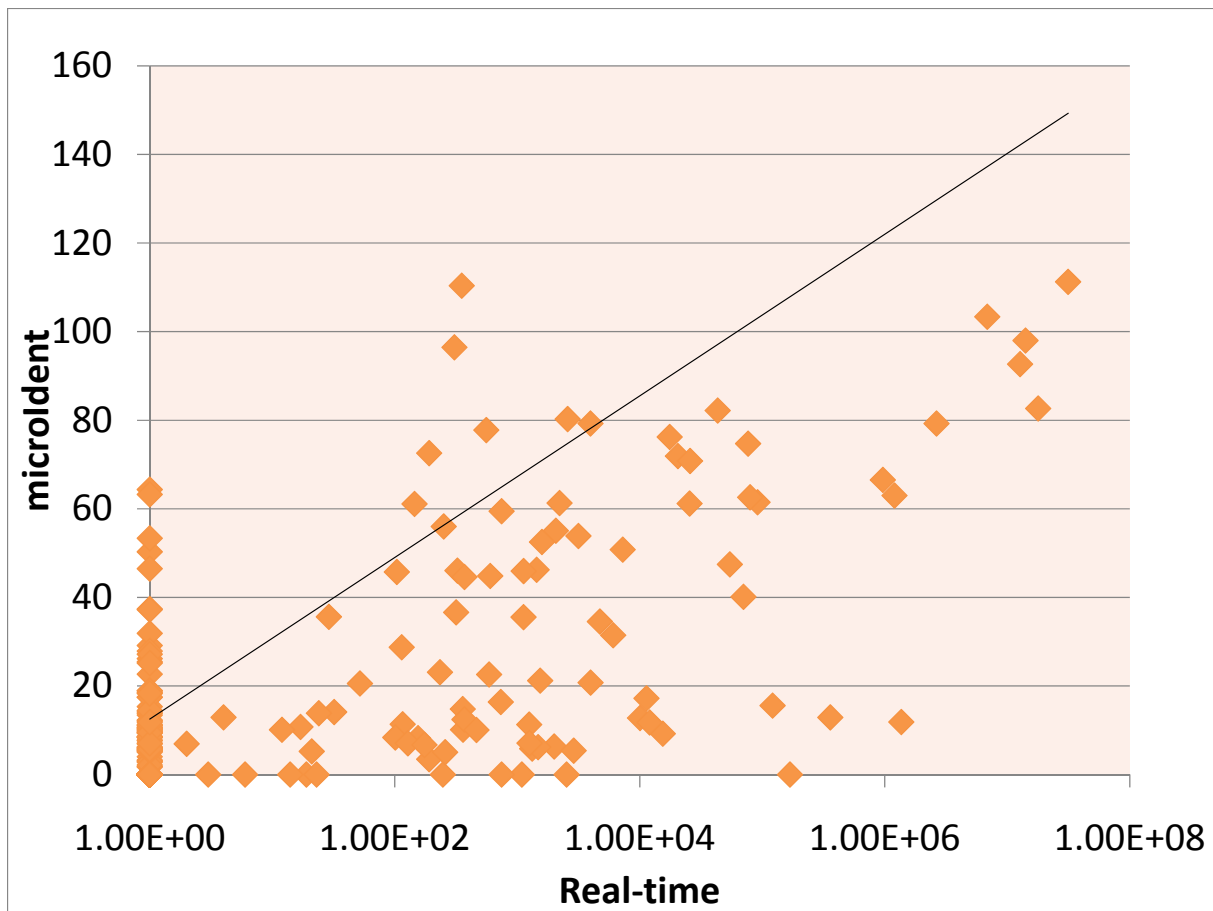


Abb. 8: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Prevotella intermedia*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *P. intermedia*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,64; ( $p < 0,001$ ).

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 11:

Kreuzdiagramm für *Prevotella intermedia* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®

P.i.		microIdent®					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-time	0	152	29	31	5	0	217
	1	7	8	17	7	4	43
	2	2	5	6	7	2	22
	3	0	1	3	5	5	14
	4	1	0	2	1	0	4
	5	0	0	1	1	6	8
Gesamt		162	43	60	26	17	308

Es lässt sich eine gute Übereinstimmung ablesen. Neun der Proben (2,92%) gaben beim microIdent®-Test ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR. Eine Probe (0,33%) gab bei der Real time-PCR ein stärkeres Signal als beim microIdent®-Test.

Tannerella forsythia

*Quantitativer Vergleich*

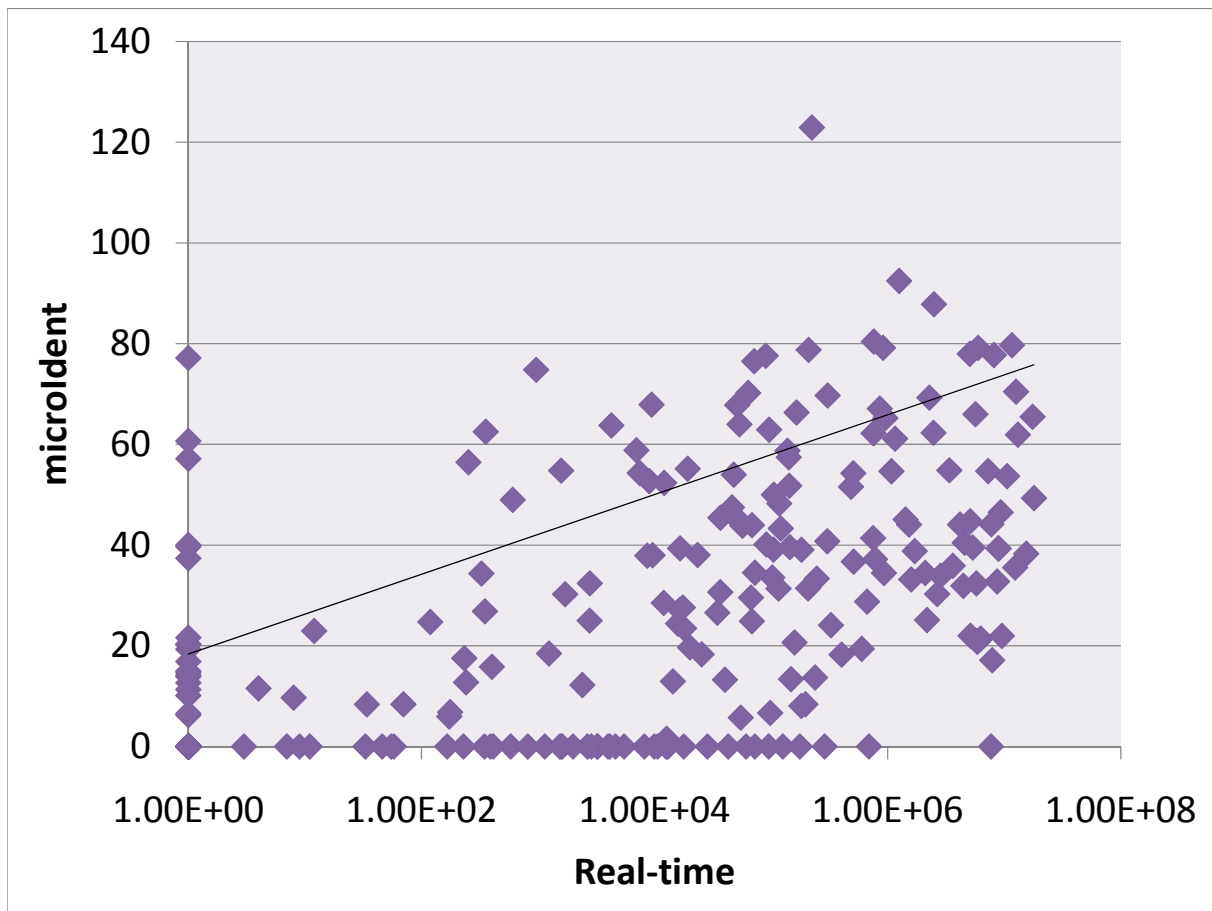


Abb. 9: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Tannerella forsythia*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *T. forsythia*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,69.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 12:

Kreuzdiagramm für *Tannerella forsythia* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®

T.forsythia		microIdent®					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-time	0	96	2	14	3	1	116
	1	15	5	8	3	1	32
	2	15	0	7	6	0	28
	3	9	3	16	12	3	43
	4	4	2	17	15	4	42
	5	1	0	21	18	7	47
Gesamt		140	12	83	57	16	308

Es lässt sich eine gute Übereinstimmung ablesen. Fünf der Proben (1,63%) gaben beim microIdent®-Test ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR. 16 Proben (5,20%) gaben bei der Real time-PCR ein stärkeres Signal als beim microIdent®-Test.



Treponema denticola

*Quantitativer Vergleich*

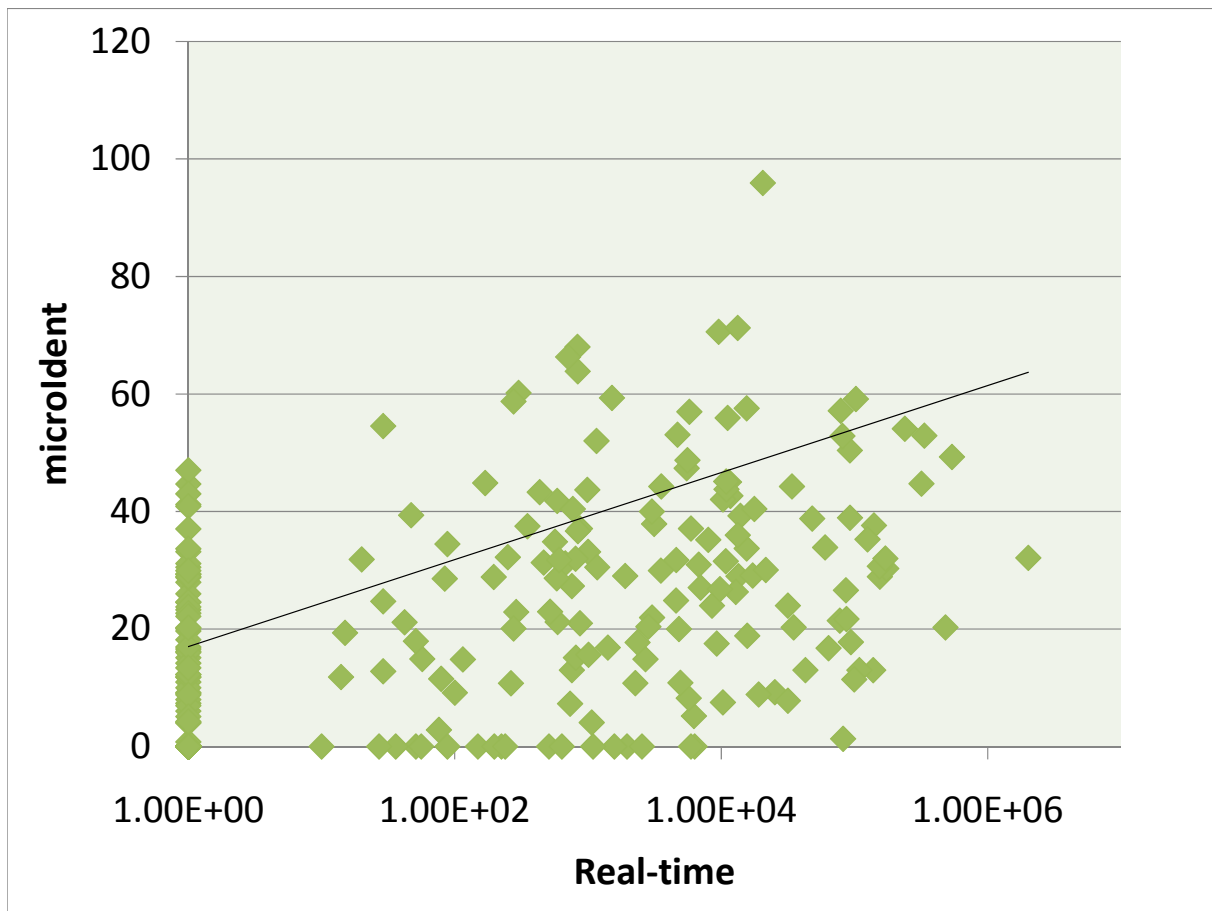


Abb. 10: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Treponema denticola*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *T. denticola*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,62.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 13:

Kreuzdiagramm für *Treponema denticola* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®

T.d.		microIdent®					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-time	0	101	12	35	5	0	153
	1	12	3	33	11	0	59
	2	6	3	23	8	1	41
	3	0	5	21	12	2	40
	4	0	0	9	5	0	14
	5	0	0	1	0	0	1
Gesamt		119	23	122	41	3	308

Es lässt sich eine gute Übereinstimmung ablesen. Fünf Proben (1,63%) gaben beim microIdent®-Test ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR.

## Parvimonas micra

### *Quantitativer Vergleich*

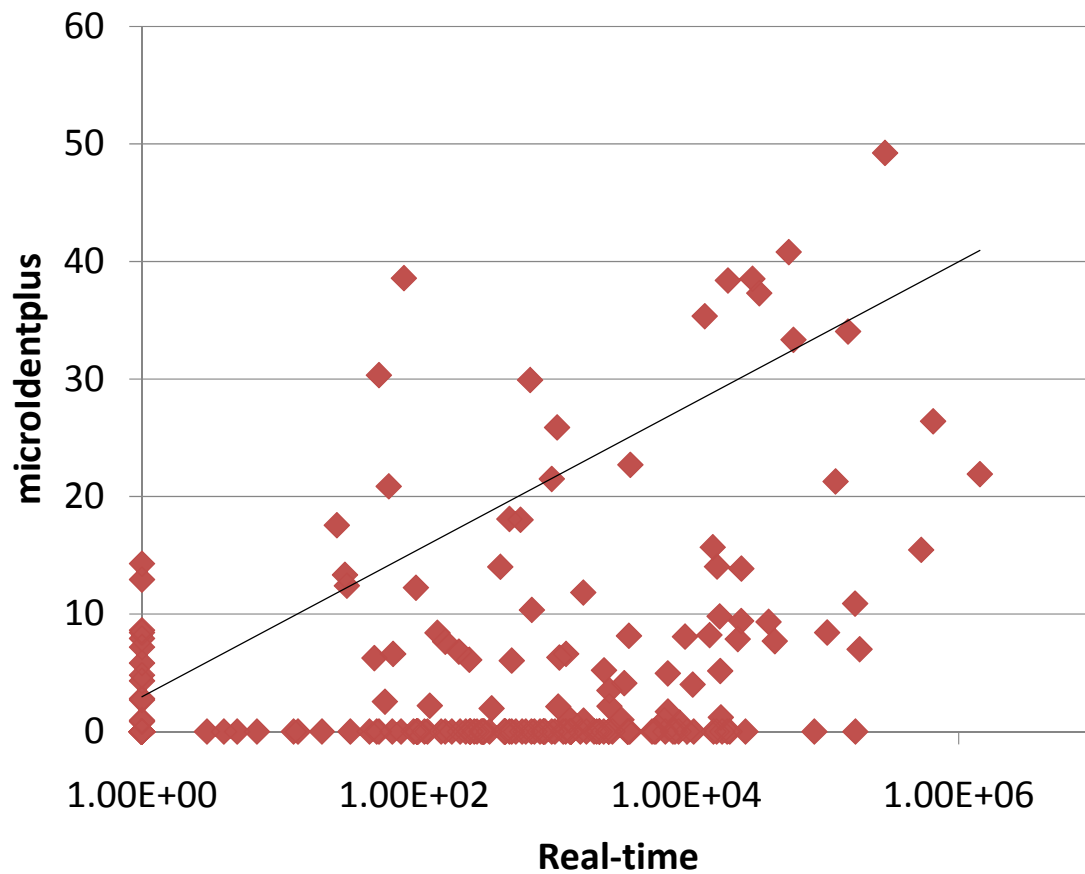


Abb. 11: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Parvimonas micra*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *P. micra*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,53.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 14:

Kreuzdiagramm für *Parvimonas micra* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®plus

P. micra		microIdent® plus				Gesamt
		0	1	2	3	
Real-time	0	141	11	2	0	154
	1	47	10	12	0	69
	2	28	16	4	0	48
	3	9	9	8	1	27
	4	1	2	5	1	9
	5	0	0	1	0	1
Gesamt		226	48	32	2	308

Eine gute Übereinstimmung lässt sich auch im Kreuzdiagramm ablesen. Zwölf Proben (3,90%) gaben bei der Real time-PCR ein stärkeres Signal als beim microIdent®plus-Test.

## Fusobacterium nucleatum

### *Quantitativer Vergleich*

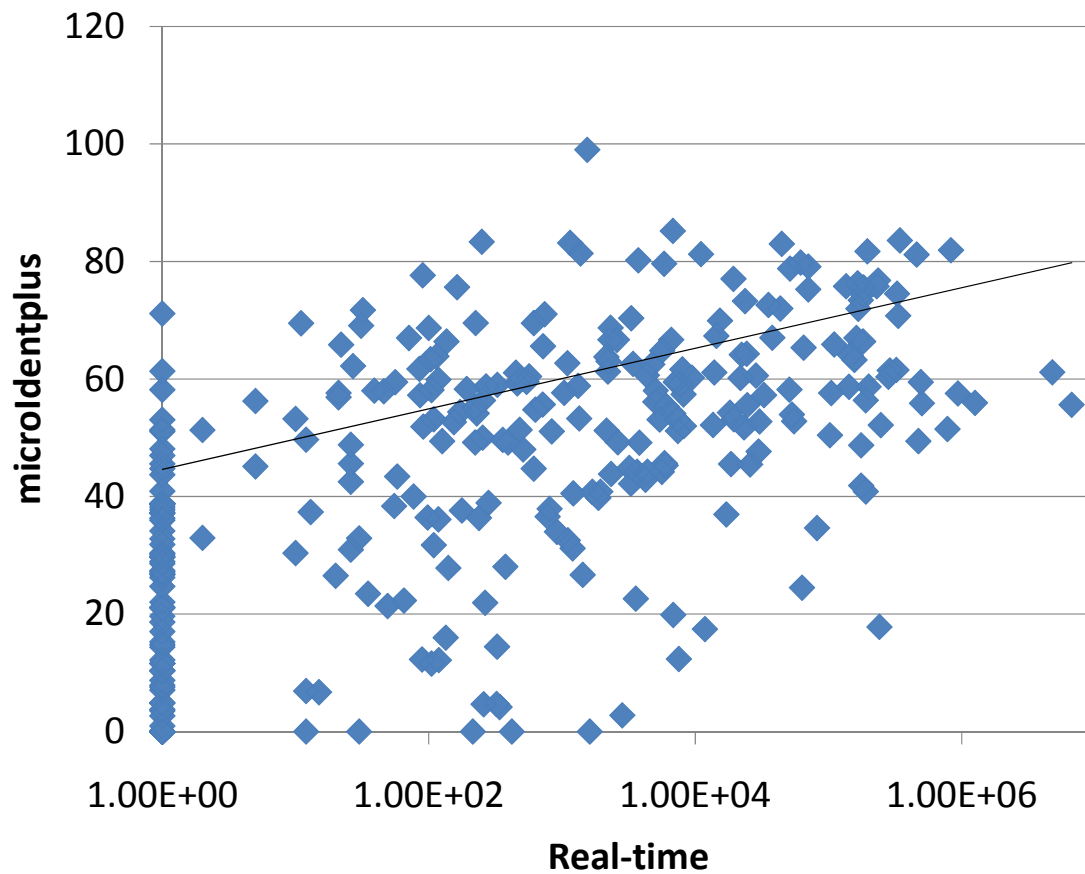


Abb. 12: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Fusobacterium nucleatum*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *F. nucleatum*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,59.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 15:

Kreuzdiagramm für *Fusobacterium nucleatum* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®plus

F. nucleatum		microIdent® plus					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-	0	14	10	38	11	1	74
time	1	4	5	27	57	5	98
	2	1	1	7	44	7	60
	3	0	0	4	22	10	36
	4	0	0	1	22	14	37
	5	0	0	0	3	0	3
Gesamt		19	16	77	159	37	308

Eine gute Übereinstimmung lässt sich auch im Kreuzdiagramm ablesen. 17 der Proben (5,52%) zeigten beim microIdent®plus ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR. Auswertend lässt sich sagen, dass die Primer bei der Real time-PCR nicht optimal waren, denn nahezu alle Proben waren beim microIdent®plus-Test positiv.

Campylobacter rectus

*Quantitativer Vergleich*

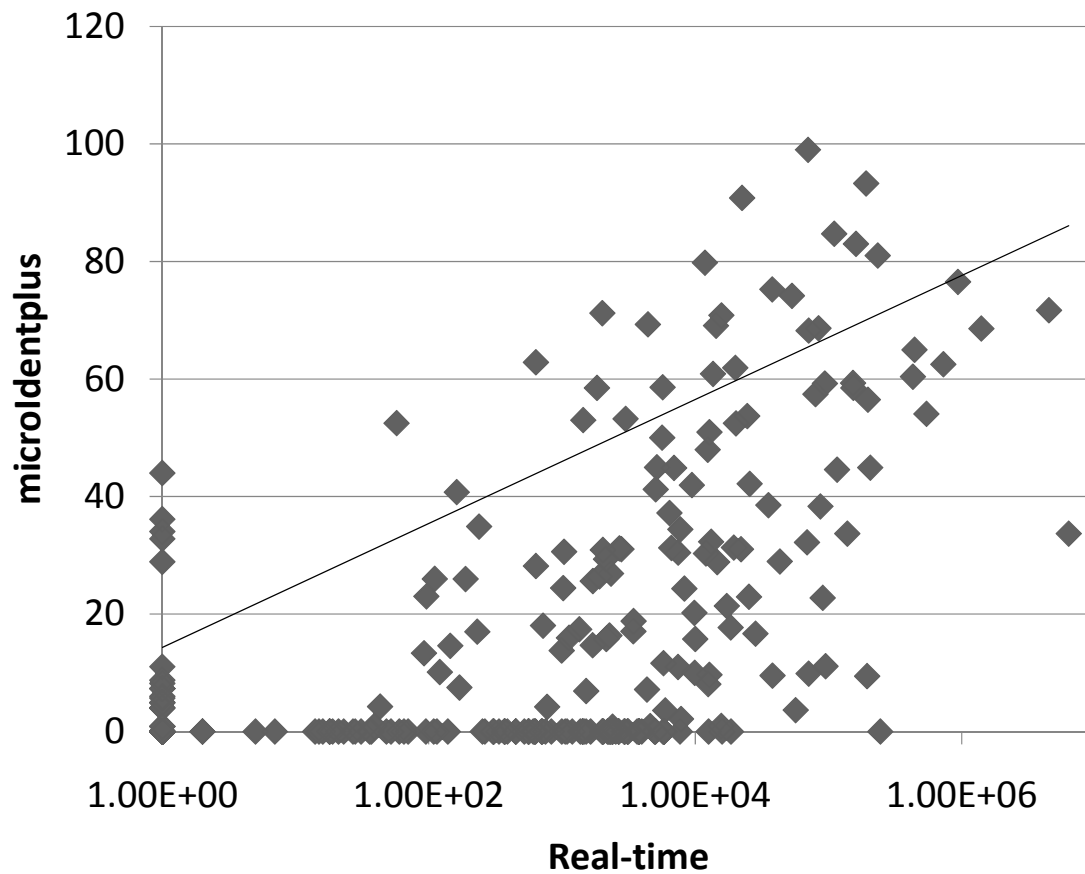


Abb. 13: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Campylobacter rectus*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *C. rectus*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,63.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 16:

Kreuzdiagramm für *Campylobacter rectus* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®plus

C. rectus		microIdent® plus					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-time	0	82	12	5	1	0	100
	1	49	4	11	3	0	67
	2	36	6	25	10	1	78
	3	3	6	16	12	6	43
	4	1	1	1	9	5	17
	5	0	0	1	1	1	3
Gesamt		171	29	59	36	13	308

Es lässt sich eine gute Übereinstimmung ablesen. Eine Probe (0,32%) zeigte beim microIdent®plus-Test ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR. Fünf Proben (1,62%) gaben bei der Real time-PCR ein stärkeres Signal als beim microIdent®plus-Test. Diskutieren ließe sich hier die Spezifität bzw. Unspezifität der Real time-PCR.



Eikenella corrodens

*Quantitativer Vergleich*

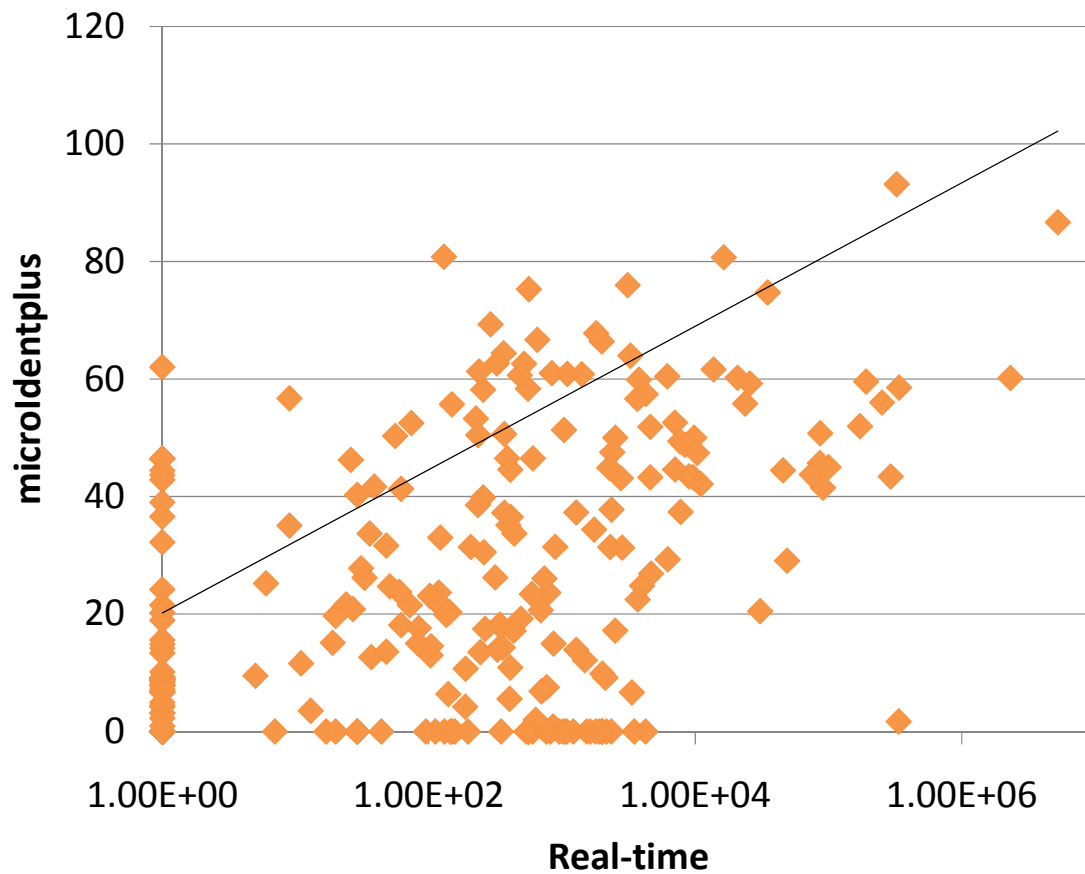


Abb. 14: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Eikenella corrodens*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *E. corrodens*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,59.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 17:

Kreuzdiagramm für *Eikenella corrodens* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®plus

E. corrodens		microIdent®plus					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-time	0	82	20	12	6	0	120
	1	21	9	53	24	2	109
	2	14	3	13	23	1	54
	3	0	0	2	11	2	15
	4	0	1	0	6	1	8
	5	0	0	0	1	1	2
Gesamt		117	33	80	71	7	308

Auch hier lässt sich wieder eine gute Übereinstimmung ablesen. Eine Probe (0,32%) gab bei der Real time-PCR ein deutlicheres Signal als beim microIdent®plus-Test. Acht Proben (2,60%) hingegen gaben beim microIdent®plus-Test ein deutlicheres Signal als bei der Real time-PCR.

## Eubacterium nodatum

### *Quantativer Vergleich*

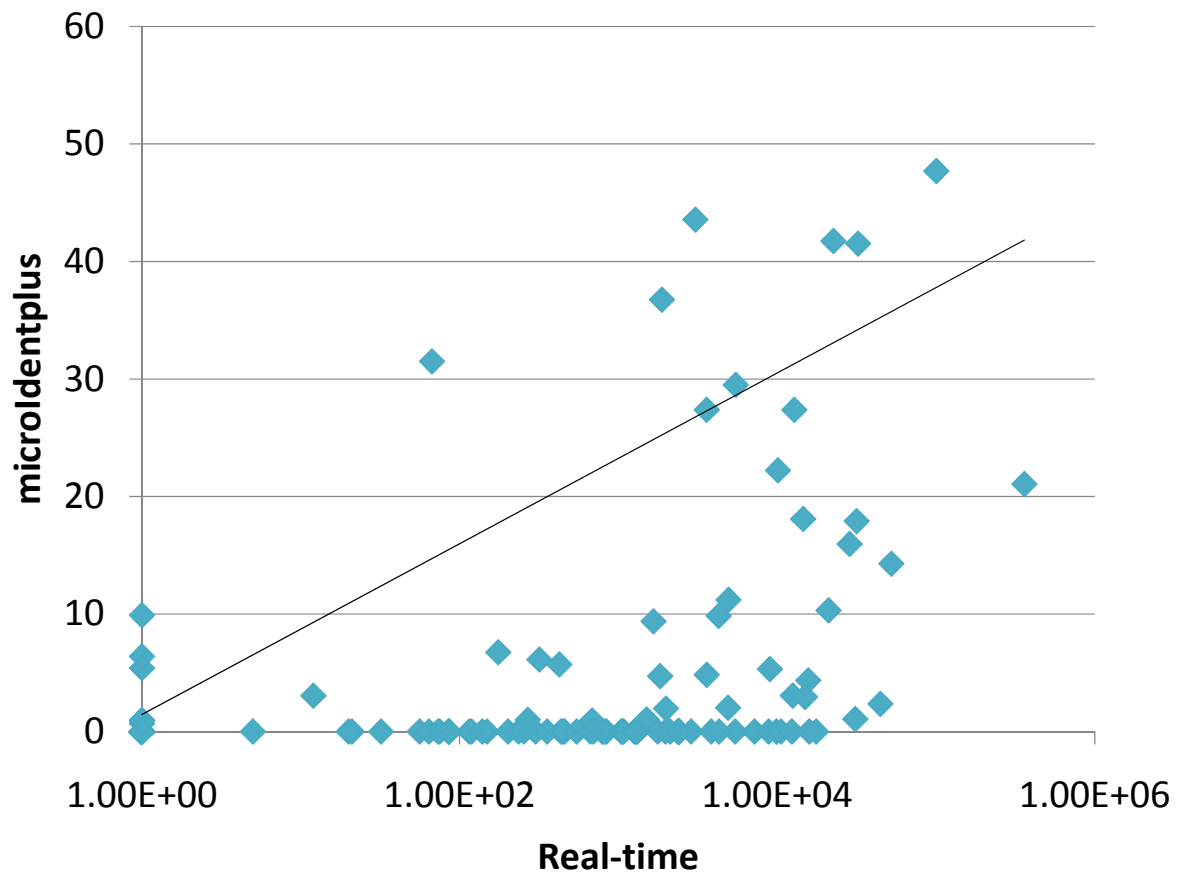


Abb. 15: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Eubacterium nodatum*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei dem Keim *E. nodatum*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,59.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 18:

Kreuzdiagramm für *Eubacterium nodatum* im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®plus

E. nodatum		microIdent®plus				Gesamt
		0	1	2	3	
Real-	0	214	6	0	0	220
time	1	29	6	1	0	36
	2	19	8	4	1	32
	3	4	5	7	2	18
	4	0	0	1	1	2
Gesamt		266	25	13	4	308

Es lässt sich eine gute Übereinstimmung ablesen. Vier Proben (1,30%) gaben bei der Real time-PCR ein stärkeres Signal als beim microIdent®plus.

Hier gab es mehr positive Werte mit der Real time-PCR, was wieder mit der Unspezifität oder der fehlenden Sensitivität des microIdent®plus-Testes erklärbar wäre.

## Capnocytophaga species

### *Quantitativer Vergleich*

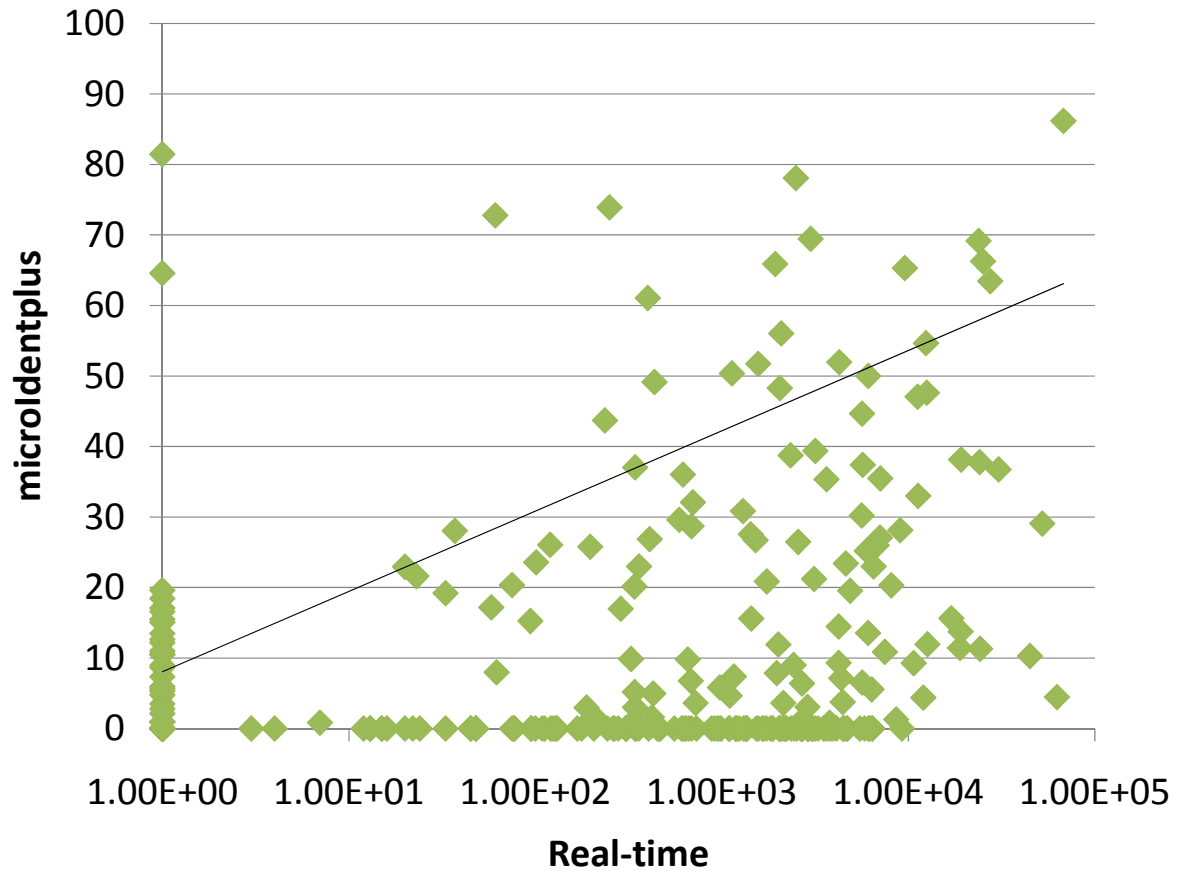


Abb. 16: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für die Keime *Capnocytophaga species*

Deutlich zu erkennen ist eine signifikante Korrelation beider Nachweismethoden bei den Keimen *Capnocytophaga species*. Der Korrelationswert nach Spearman beträgt 0,33.

Die Signifikanz beträgt  $< 0,001$ .

### *Semiquantitativer Vergleich*

Tabelle 19:

Kreuzdiagramm für *Capnocytophaga* species im semiquantitativen Vergleich zwischen der Real time-PCR und dem microIdent®plus

C. species		microIdent®plus					Gesamt
		0	1	2	3	4	
Real-	0	58	12	12	1	1	84
time	1	57	14	19	3	2	95
	2	57	15	25	10	1	108
	3	0	3	11	6	1	21
Gesamt		172	44	67	20	5	308

Wiederum lässt sich auch im Kreuzdiagramm eine gute Übereinstimmung ablesen.

Vier Proben (1,30%) gaben beim microIdent®plus-Test ein stärkeres Signal als bei der Real time-PCR.

## **5.2 Beurteilung des Therapieerfolges**

Um die Frage beantworten zu können, ob die Bestimmung der Keimzahlen nach durchgeführter zahnärztlicher Lokalthherapie in der Lage ist, eine Aussage zum Therapieerfolg zu treffen, wurden die klinischen Parameter der Patienten zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten mit den durch Anwendung des microIdent®/microIdent®plus - Tests ermittelten Luminanzwerte der parodontopathogenen Bakterien korreliert. Dabei fand das Stufenschema für die semiquantitative Auswertung erneut Anwendung (vgl. Tabelle 8). In den nachfolgenden Abbildungen 17-27 bedeuten keine Keimbelastung = Stufe 0, geringe Keimbelastung = Stufe 1, mittlere Keimbelastung = Stufe 2, hohe Keimbelastung = Stufe 3 und sehr hohe Keimbelastung = Stufe 4.

Als Therapieerfolg wurde eine Sondierungstiefe von  $\leq 3$ mm 12 Monate nach Scaling & Root Planing festgesetzt. In diese Analyse wurden insgesamt 71 Sites einbezogen, bei 52 wurde die Zielvorgabe erreicht (n= 52:Therapieerfolg ja), bei 19 nicht (n= 19: Therapieerfolg nein). Diese Berechnungen sind als Säulendiagramme dargestellt.

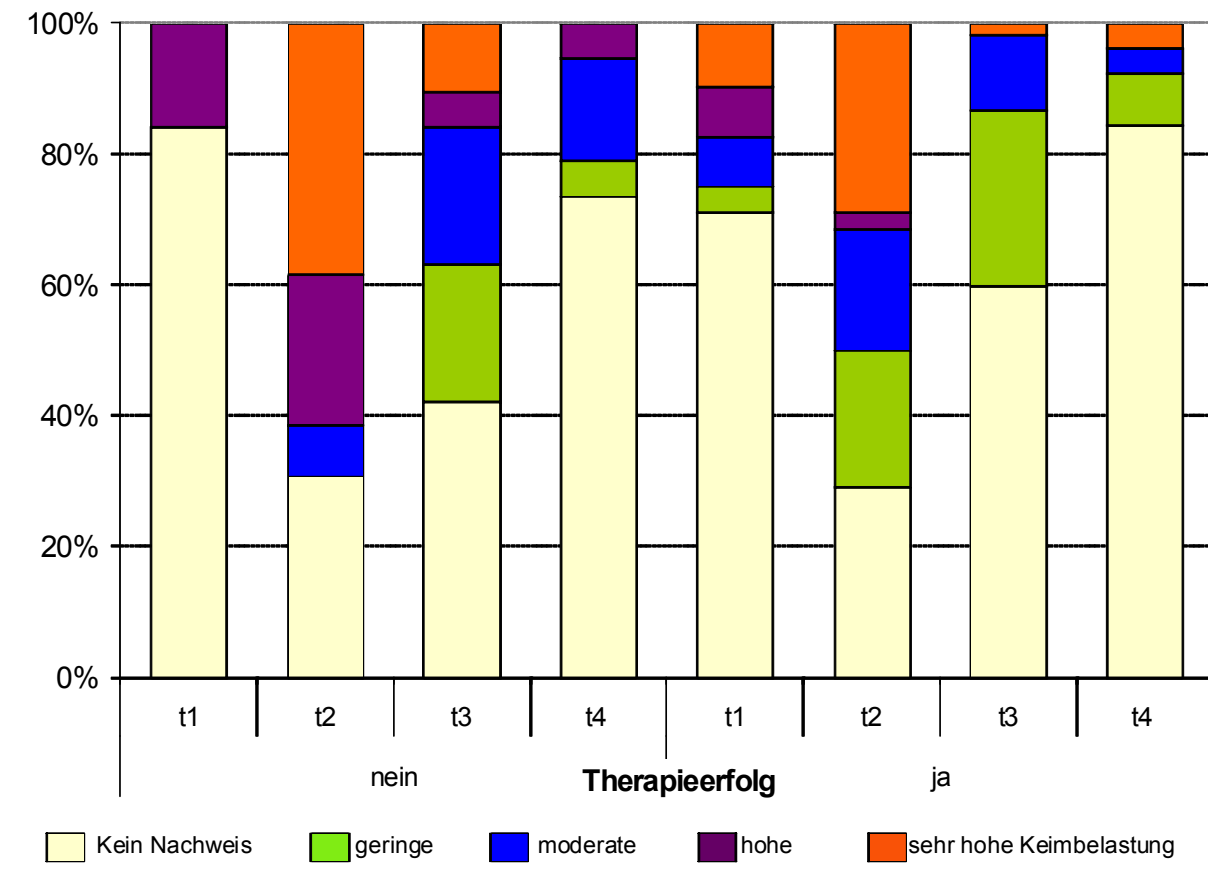


Abb. 17: Keimbelastung mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Nach den Berechnungen mit dem Statistik Mann-Whitney-Test gab es zu keinem Zeitpunkt zwischen beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Keimbelastung mit *A. actinomycetemcomitans*. Im Laufe der Therapie reduzierte sich die Keimbelastung in beiden Gruppen. Allerdings waren nur in den Sites mit Therapieerfolg die Keimzahlen 12 Monate nach Therapie signifikant ( $p < 0,05$ ) niedriger als zu Beginn.

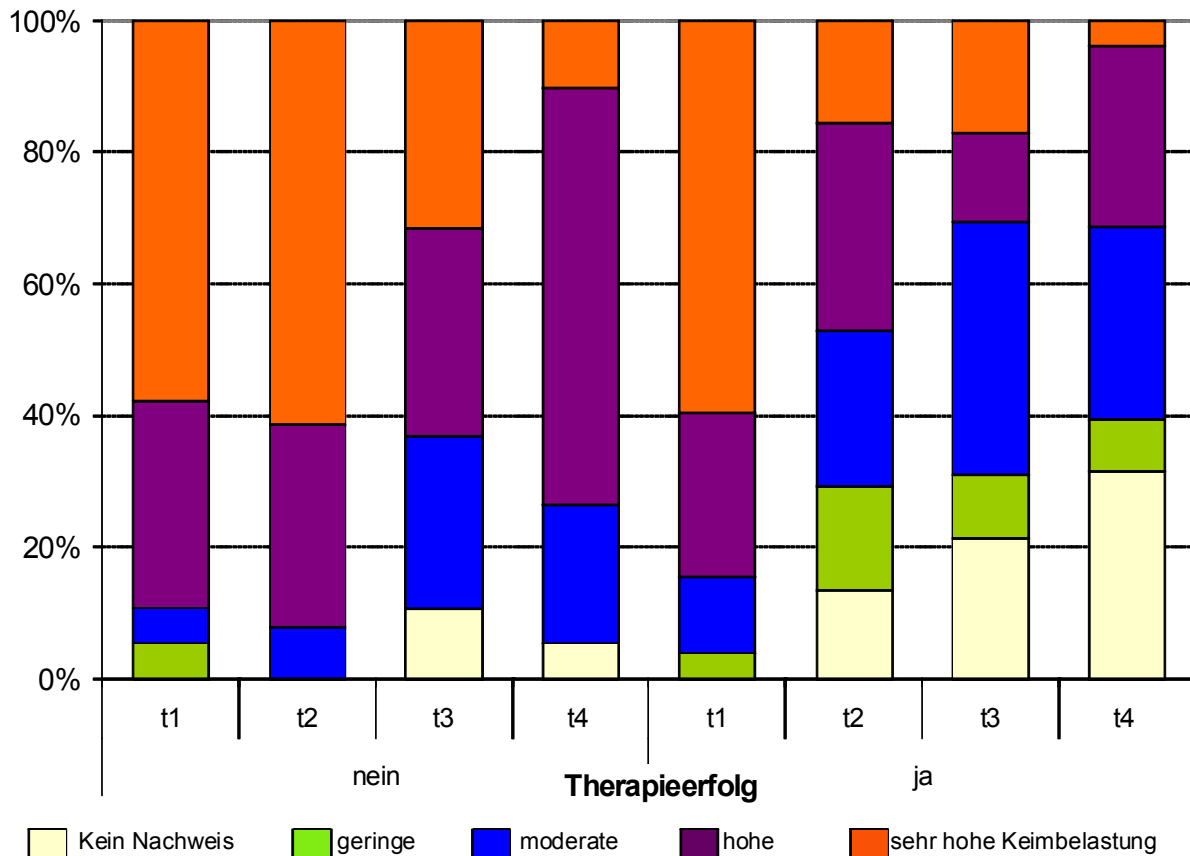


Abb. 18: Keimbelastung mit *Porphyromonas gingivalis* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Im Falle von *P. gingivalis* lässt sich deutlich ein Zusammenhang zwischen einer erfolgreichen Parodontitistherapie und dem Rückgang der Keimbelastung erkennen. Bereits drei Monate nach SRP ist der Unterschied zur ursprünglichen Keimbelastung als höchst signifikant zu bezeichnen, während in den Fällen erfolgloser Therapie die Belastung mit *P. gingivalis* zu keinem Kontrollzeitpunkt signifikant gesunken war.



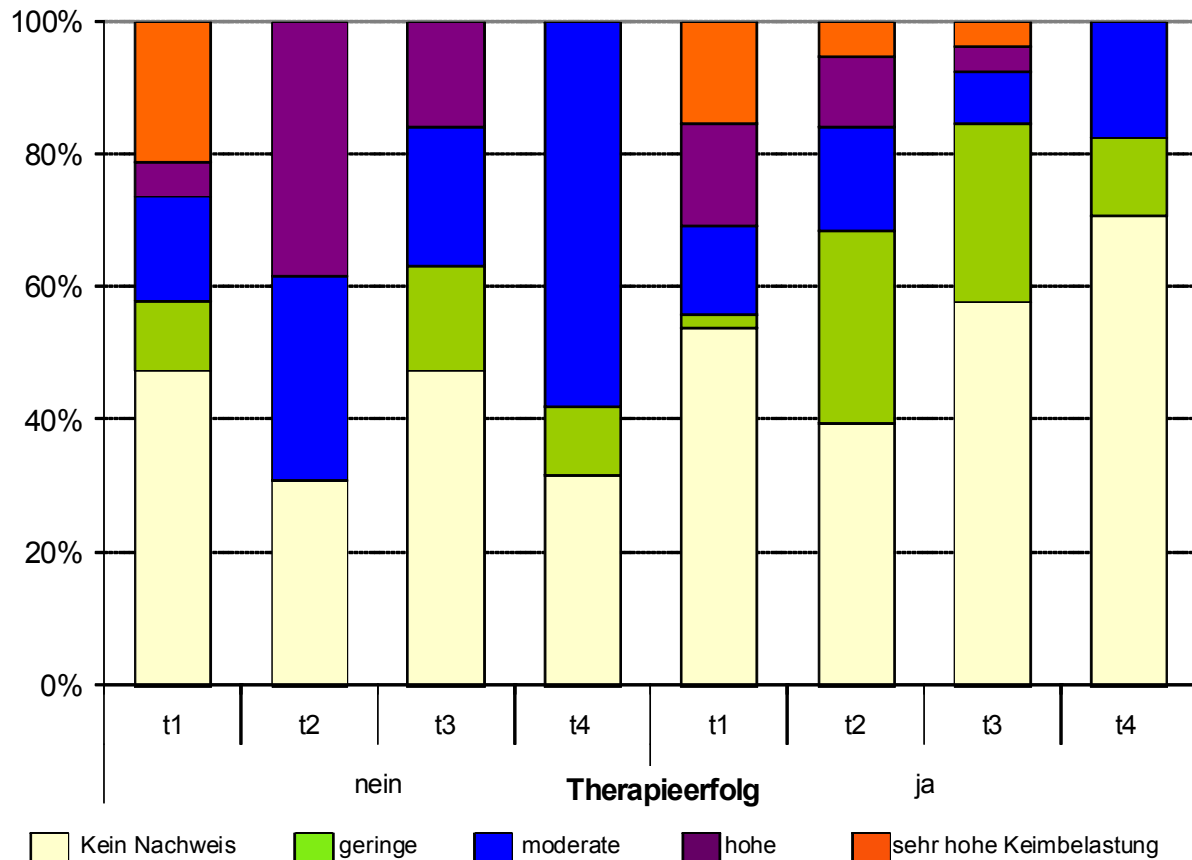


Abb. 19: Keimbelastung mit *Prevotella intermedia* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Im Falle des Therapieerfolges war hier 6 Monate nach SRP ein signifikanter Rückgang der Keimzahl zu verzeichnen. Demgegenüber war im Falle des Therapiemißerfolges auch 12 Monate nach SRP noch eine moderate Keimbelastung zu beobachten.

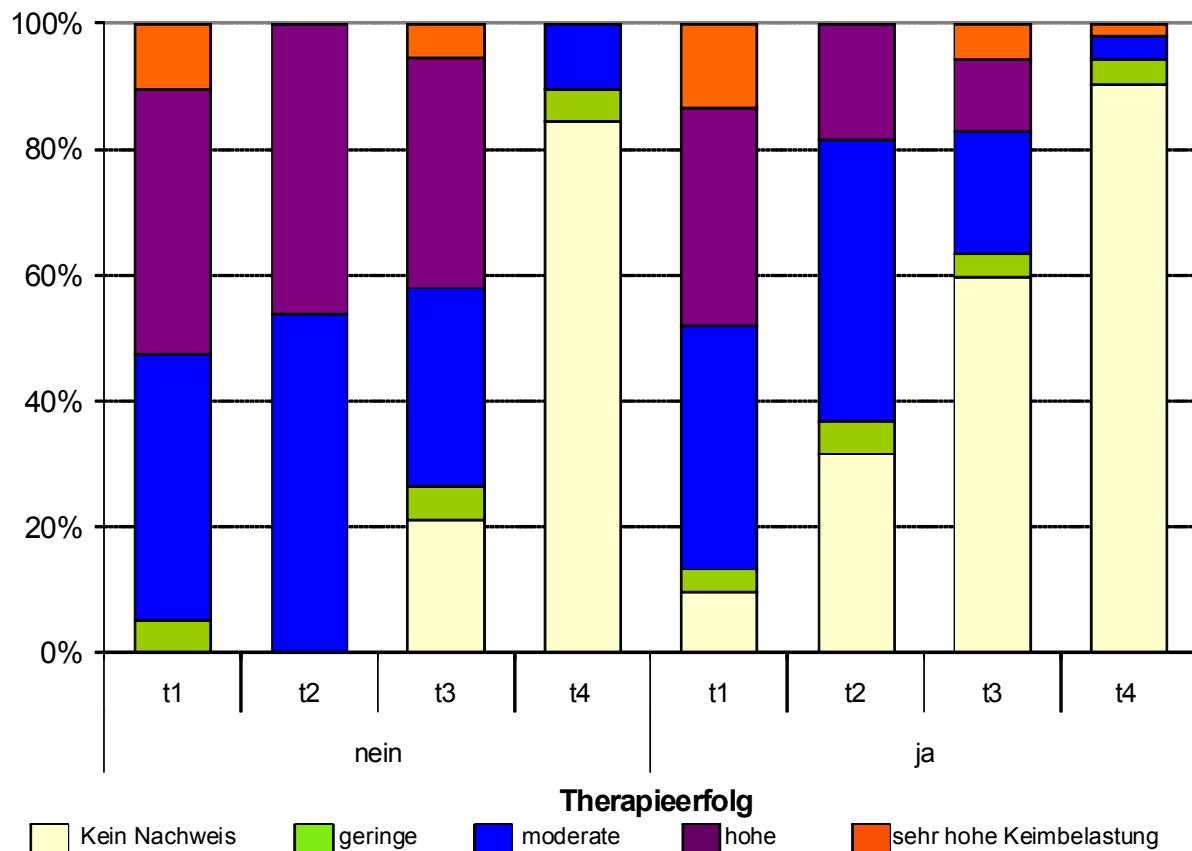


Abb. 20: Keimbelastung mit *Tannerella forsythia* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Hier lässt sich im Fall erfolgreicher Therapie bereits 3 Monate nach SRP ein signifikanter Rückgang der Keimzahl beobachten. Im Gegensatz dazu sank im Falle des Misserfolges die Keimzahl zunächst nicht signifikant; und 12 Monate nach SRP bestand noch eine moderate Keimbelastung.

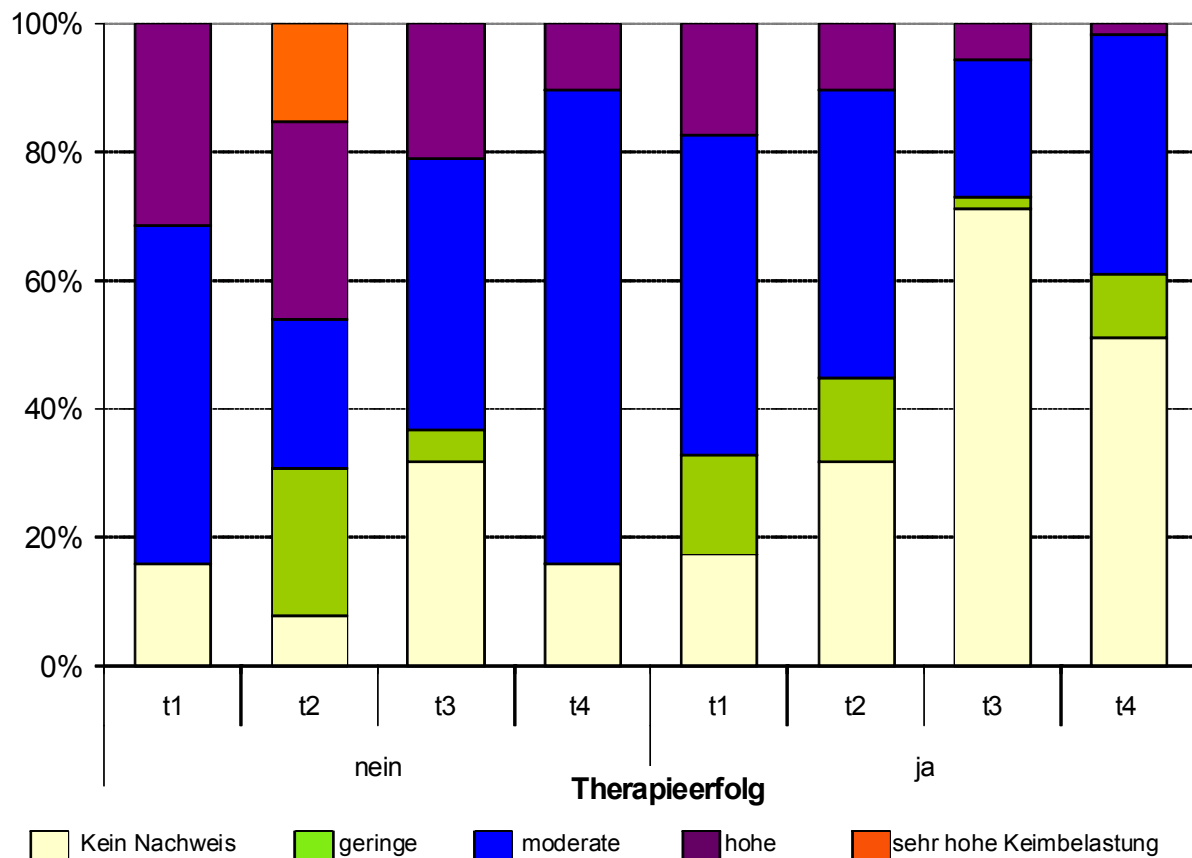


Abb. 21: Keimbelastung mit *Treponema denticola* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Nach erfolgreicher Therapie war ein signifikanter Rückgang der Keimzahl von *T. denticola* 6 Monate nach SRP zu beobachten. Hingegen war nach erfolgloser Therapie kein Rückgang der Keimzahl zu verzeichnen.

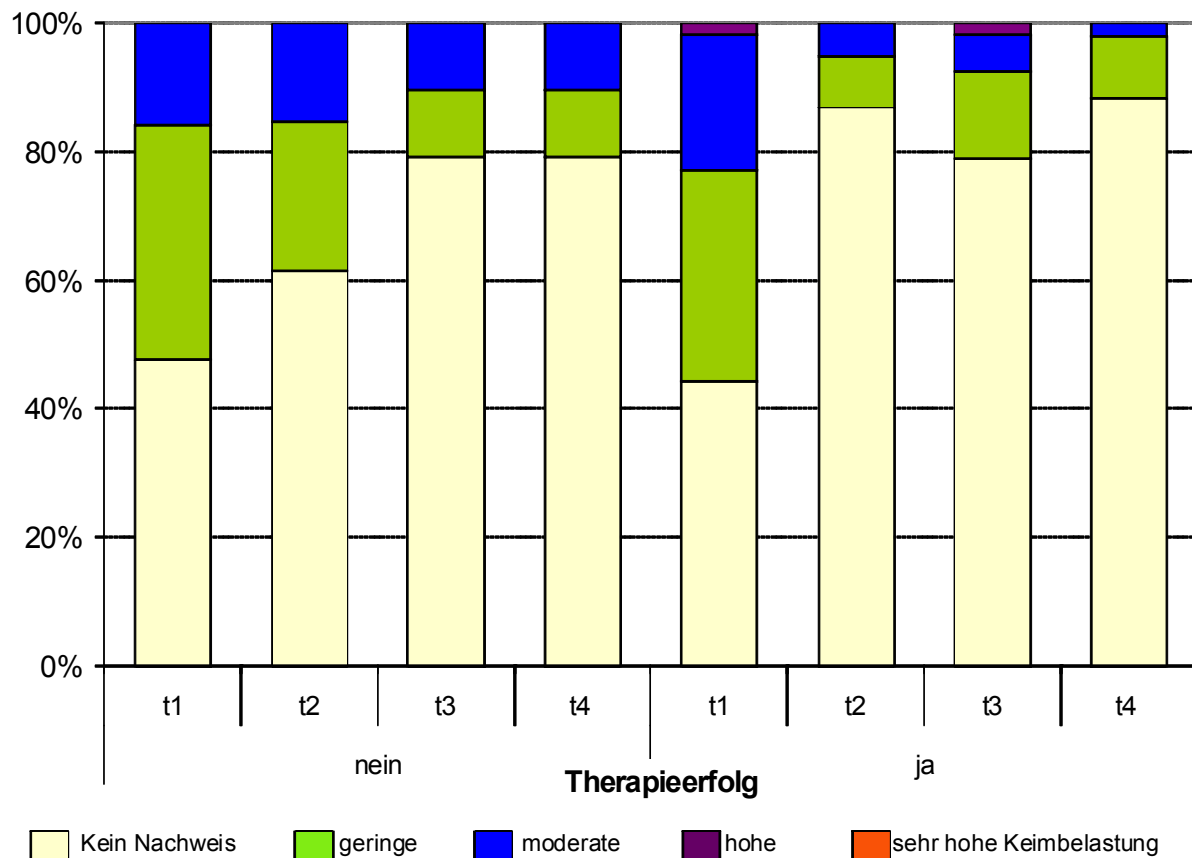


Abb. 22: Keimbelastung mit *Parvimonas micra* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Hinsichtlich der Keimbelastung mit *P. micra* war bei Therapieerfolg bereits 3 Monate nach SRP ein signifikanter Rückgang der Keimzahl zu beobachten. Im Fall der erfolglosen Therapie erwies sich der Rückgang der Keimzahlrückgang als nicht signifikant.

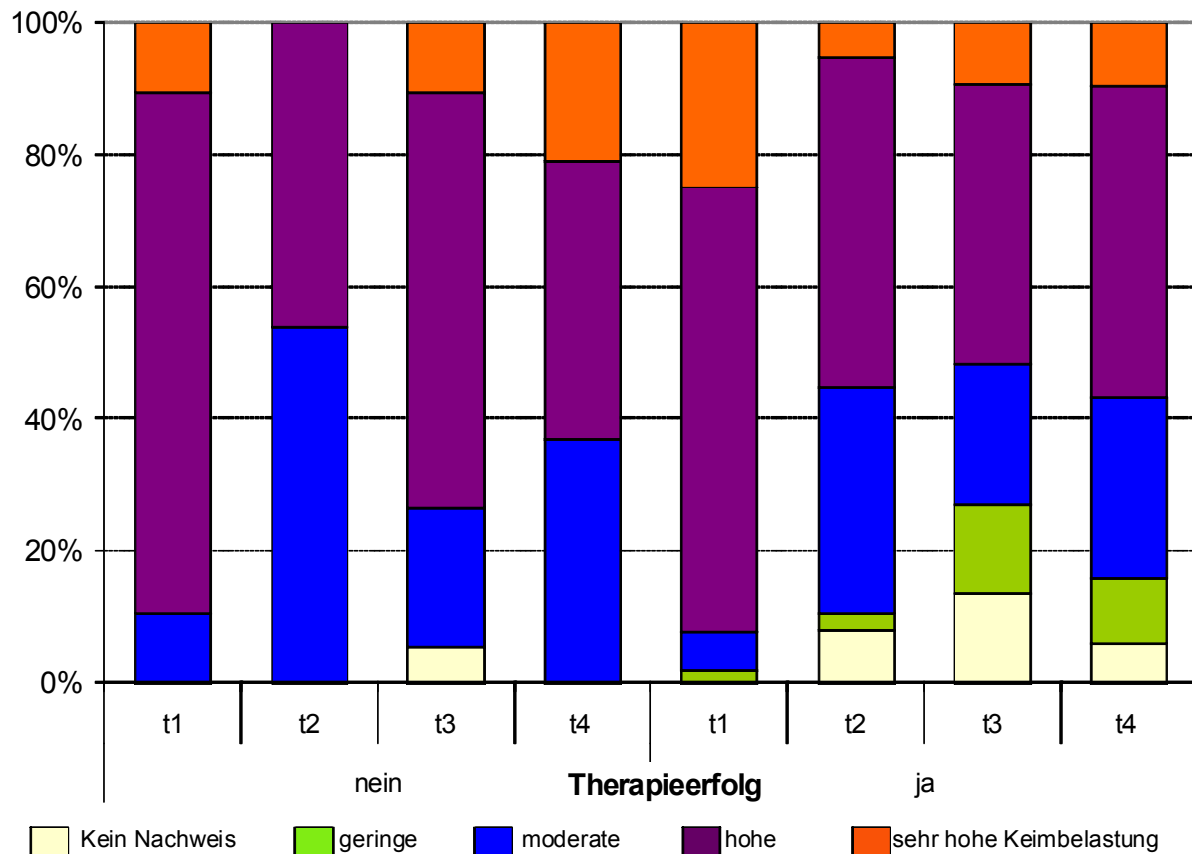


Abb. 23: Keimbelastung mit *Fusobacterium nucleatum* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Nach erfolgreicher Therapie sank die Keimbelastung mit *F. nucleatum* nach bereits 3 Monaten nach SRP signifikant, bei nicht erfolgreicher Therapie sank die Keimbelastung zunächst 6 Monate nach SRP signifikant, stieg dann aber 12 Monate nach SRP wieder an.

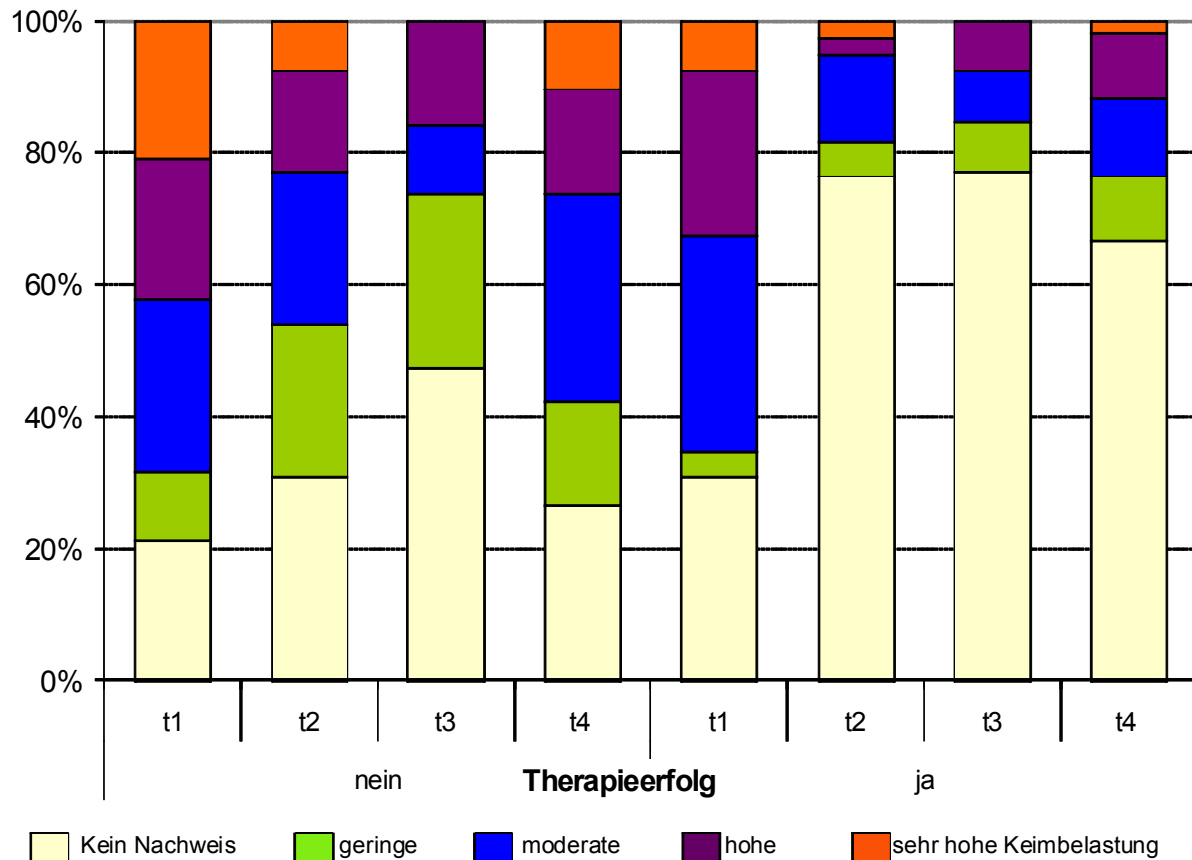


Abb. 24: Keimbelastung mit *Campylobacter rectus* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Bei Therapieerfolg sank die Keimbelastung vom ersten Kontrollzeitpunkt an signifikant und blieb bis 12 Monate nach SRP signifikant niedrig. Bei nicht erfolgreicher Therapie wurden signifikant niedrigere Keimzahlen 6 Monate nach SRP registriert, hier wurde später ein leichter Anstieg beobachtet.

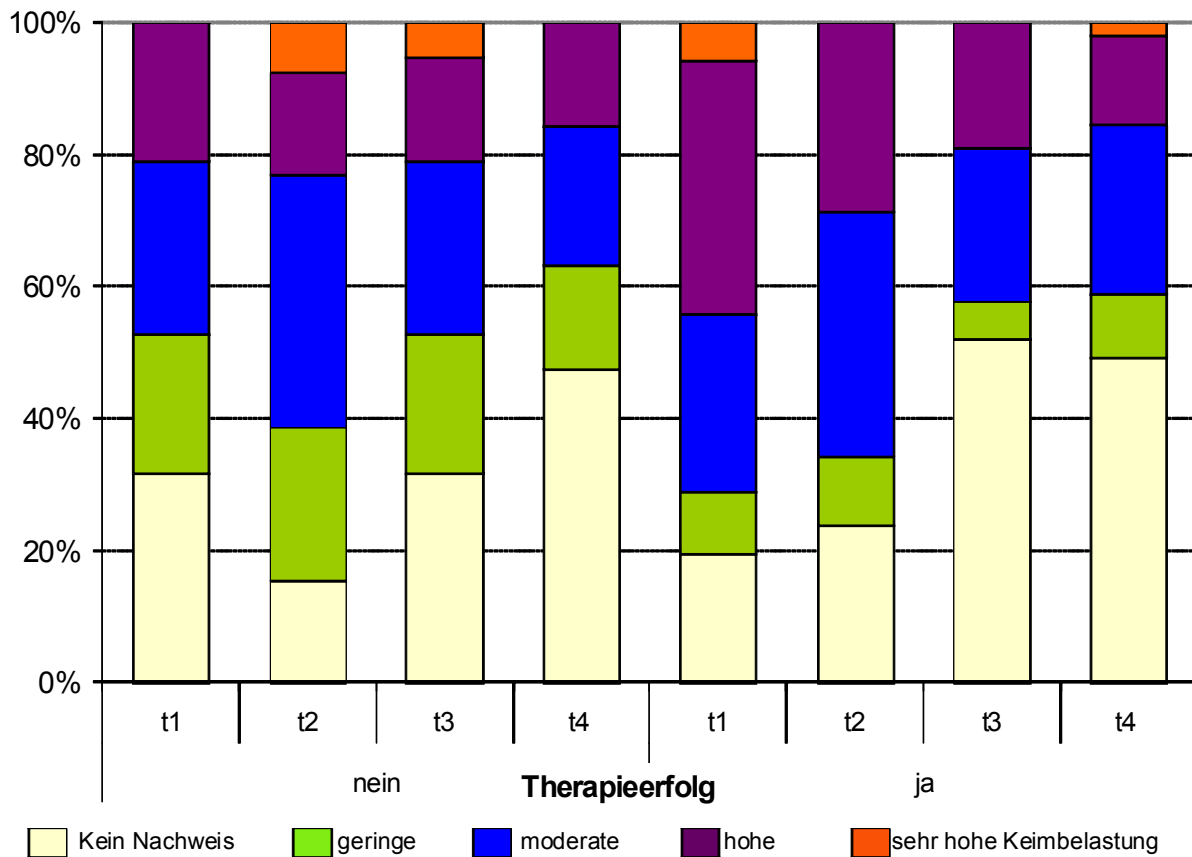


Abb. 25: Keimbelastung mit *Eikenella corrodens* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Im Laufe der Therapie reduzierte sich die Keimbelastung mit *E. corrodens* in beiden Gruppen. Allerdings waren nur in den Sites mit Therapieerfolg die Keimzahlen 6 und 12 Monate nach Therapie deutlich signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als zu Beginn.

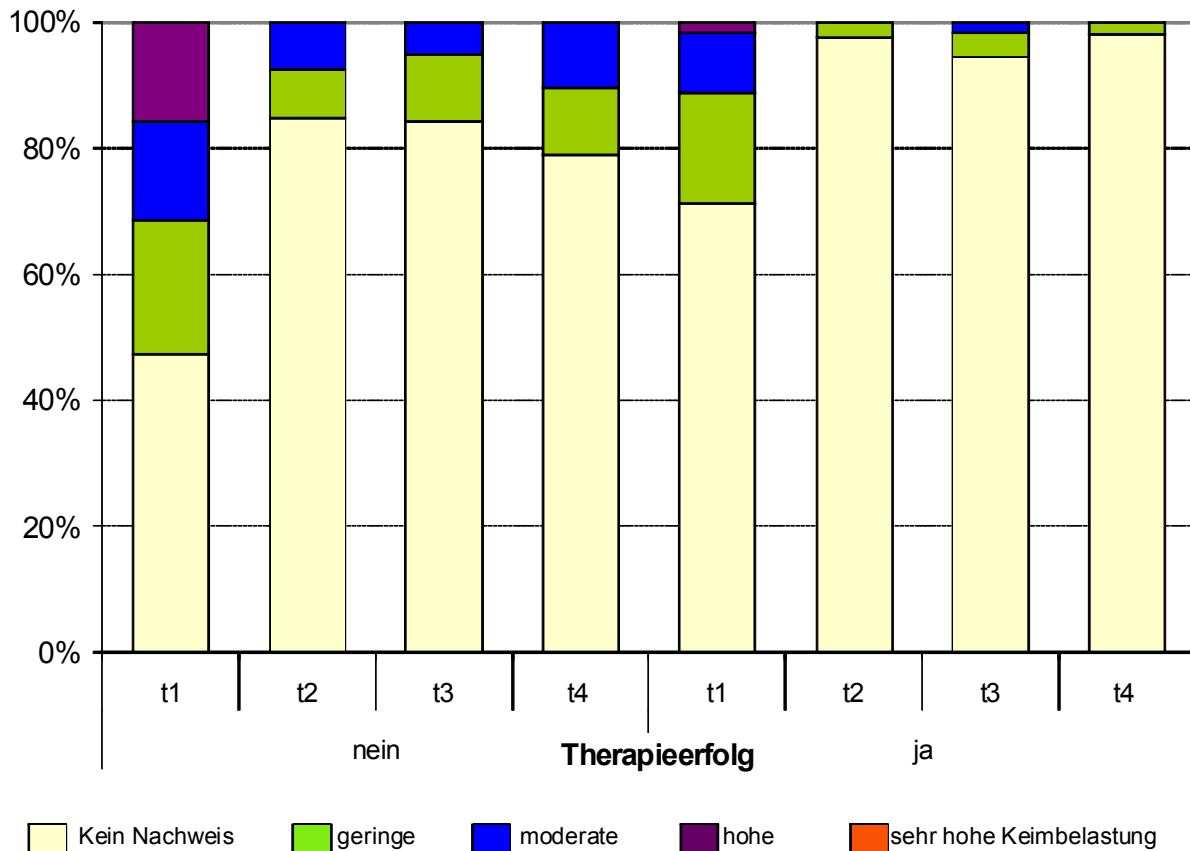


Abb. 26: Keimbelastung mit *Eubacterium nodatum* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

Im Laufe der Therapie sank die Keimbelastung mit *E. nodatum* in beiden Gruppen. Allerdings waren nur in den Sites mit Therapieerfolg die Keimzahlen 6 und 12 Monate nach Therapie deutlich signifikant ( $p=0,001$ ) niedriger als zu Beginn.



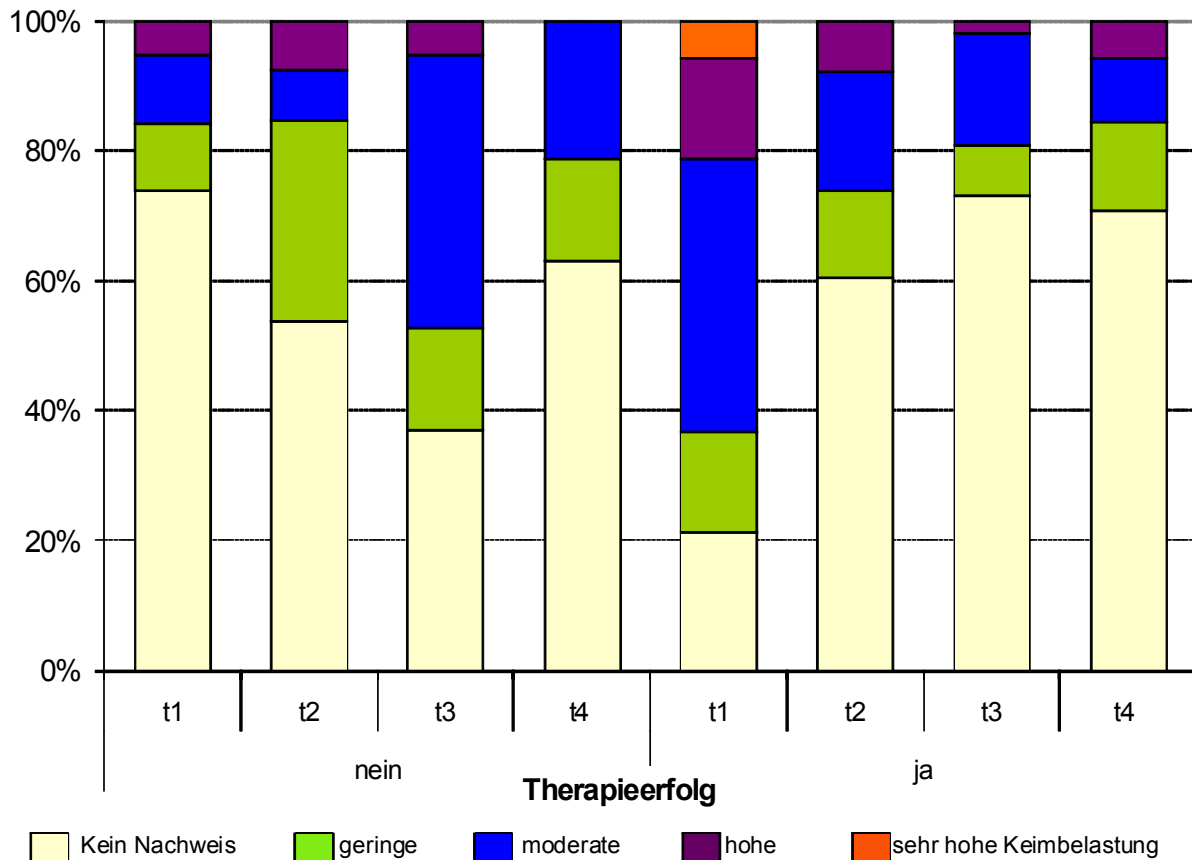


Abb. 27: Keimbelastung mit *Capnocytophaga* species in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

In Bezug auf die Keimbelastung mit *Capnocytophaga* sp. bestanden Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu Beginn, die Keimbelastung war hier in der Gruppe mit späterem Therapieerfolg größer. Diese sank 3 Monate nach SRP auf signifikant niedrige Werte. Bei Therapiemisserfolg wurde jedoch eine Tendenz zu höheren Keimzahlen im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn beobachtet.

## 6. Diskussion

### 6.1 Methodik

Nukleinsäurebasierte Verfahren sind eine bewährte Methoden zur Detektion parodontopathogener Mikroorganismen. Sie stellen den Goldstandard der heutigen Diagnostik dar (Pihlstrom 2001, Eick et al. 2002). In vorliegender Studie wurden zwei Methoden miteinander verglichen, die In house Real time-PCR-Methode und der auf PCR und Hybridisierung basierende microIdent®-Kit (DNA STRIP-Technologie).

#### *Real-time*

Für die Real time-PCR wurden Primer ausgewählt, die bereits in anderen Applikationen Anwendung fanden (Ashimoto et al. 1996, Fouad et al. 2002, Hayashi et al. 2001, Kook et al. 2002, Song et al. 2003, Tran & Rudney 1999, Vandamme et al. 1993, Vandamme et al. 1996). Für die Evaluierung dieser Methode wurden Referenzstämmen und bekannte Plaqueproben verwendet (Guentsch et al. 2008). Bei den Kontrollen war durchgehend eine hohe Sensitivität der Real time-PCR erkennbar.

Bei dieser Methode sind die Kosten für das Verbrauchsmaterial vergleichsweise niedrig, wenn entsprechende Geräte bereits im Labor vorhanden sind. Die finanzielle Grundinvestition in einen PCR Vollautomaten mit Real-time Funktion ist außerordentlich hoch.

In der hier verwandten In house Real time-PCR kam SYBR Green I zur Anwendung, welches sich unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet. Die universelle Verwendbarkeit dieses Farbstoffs ist vorteilhaft, weil damit jede beliebige PCR-Reaktion verfolgt werden kann. Die Signalstärke ist hoch, da jedes DNA-Molekül mehrere Farbstoffmoleküle bindet. Der Nachteil allerdings ist, dass man nicht mehr zwischen korrektem Produkt und Artefakten unterscheiden kann. Das ist ein erhebliches Problem, denn Artefakte kommen bei der PCR häufig vor (Mülhardt 2002). Diesem Problem konnte begegnet werden, indem nach abgelaufener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wurde, anhand derer die Fragmentlängen (n) und dadurch die Spezifität bestimmt werden konnten. Innerhalb dieser Schmelzkurvenanalyse wurde die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wurde (50°C bis 95°C). Bei der für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturierte der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wurde der Fluoreszenzfarbstoff

SYBR Green I freigesetzt, und es wurde eine Fluoreszenzabnahme registriert (Wikipedia, [http://de.wikipedia.org/wiki/Real\\_time\\_quantitative\\_PCR](http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR)).

Diese preisgünstige, weitverbreitete Methode besitzt allerdings Nachteile, die in der Farbinstabilität oder einer Hemmung der PCR-Reaktion liegen (Monis et al. 2005). Um Farbinstabilitäten zu vermeiden wurde in der vorliegenden Studie der Farbstoff direkt dem PCR-Puffer hinzugefügt, dennoch kann eine Hemmung der PCR in bestimmten Fällen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Die Real time-PCR Methode mit SYBR Green I ist ein empfindliches und störanfälliges Verfahren. Bei negativen Ergebnissen wurden im zweiten PCR-Lauf häufig positive Keimzahlen nachgewiesen. Deshalb ist eine Doppelbestimmung der Proben von vorn herein anzuraten.

#### *microIdent®*

Die DNA STRIP-Technologie ist laut Hersteller Hain Lifescience durch hohe Sensitivität und maximale Spezifität gekennzeichnet. Aus dem Probenmaterial wurde die DNA oder RNA zunächst isoliert, dann mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und anschließend über eine Hybridisierung und alkalische Phosphatase-Reaktion auf einem Membranstreifen detektiert. Nach der Isolation der fraglichen DNA wurde die Nukleinsäure in einer Amplifikationsreaktion mittels (multiplexer) PCR selektiv vermehrt.

Im nächsten Schritt wurden die Amplifikate chemisch denaturiert, da die Detektion auf dem DNA-Streifen nur anhand einzelsträngiger DNA erfolgen konnte. Ein solcher DNA-Streifen ist mit hochspezifischen Sonden beschichtet, die komplementär zu der selektiv amplifizierten Nukleinsäure sind. Im Verlauf der Hybridisierung band das einzelsträngige Amplifikat spezifisch an die Sonde, während unspezifisch gebundene Amplifikate in anschließenden Waschschritten entfernt wurden. Das spezifisch gebundene Amplifikat wurde während der Konjugat-Reaktion mit dem Enzym alkalische Phosphatase markiert und danach in einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht. Dadurch entstand auf dem DNA-Streifen ein spezifisches Bandenmuster. Durch das Anlegen einer testspezifischen Auswertungsschablone ließ sich das Testergebnis schnell und eindeutig ablesen. Eine sichere Bestimmung der Bakterienspezies war möglich. Herstellerinterne Kontrollen sollen eine gleichbleibende Qualität des Materials und damit die Validität der erzielten Ergebnisse sicherstellen.

Die Anwendungskosten sind relativ niedrig, da eine teure Geräteausstattung entfällt. Auch kleine Serienlängen können mit geringem Kostenaufwand abgearbeitet werden. Für größere Serienlängen bietet der Hersteller Automationslösungen zur Detektion auf den DNA-Streifen an. Dies ermöglicht Laboratorien jeder Größe eine optimale Integration in die Arbeitsabläufe (Hain-lifescience 2010).

Nun setzte sich die Studie aber die Quantifizierung dieses semiquantitativen Verfahrens zum Ziel. Das sollte durch das Verfahren der Densitometrie realisiert werden. Die Auswertung der oben genannten Tests der Firma Hain Lifescience erfolgte durch die Beurteilung sichtbarer Banden auf einem Nitrozellulosestreifen, wobei die Stärke der Banden mit der Menge der nachweisbaren bakteriellen DNA korrelierte. Um diese Korrelation zu quantifizieren, wurden die Banden mit der Methode der Densitometrie beurteilt. Es sollte somit überprüft werden, ob nunmehr eine zahlenmäßige Quantifizierung des eigentlich semiquantitativen Tests erreicht werden kann. Da diese Quantifizierung gelang, konnte ein direkter Vergleich mit den Zahlen der DNA-Kopien der Real time-PCR angestellt werden.

Inzwischen wird innerhalb der Firma Hain Lifescience eine automatisch ablaufende Quantifizierung erprobt (persönliche Mitteilung Dr. Eick)

## **6.2 Nukleinsäurebasierte Verfahren in der mikrobiologischen Diagnostik von Parodontalerkrankungen**

In der subgingivalen Mikroflora sind mehr als 300 verschiedene Bakterienspezies vertreten. Verschiedene Verfahren dienen dazu, die Vielfalt der Mikroflora zu analysieren. Seit mehreren Jahren wurde insbesondere die Checkerboard-Hybridisierung (Socransky et al. 1994), (Socransky et al. 1998), (Socransky et al. 2004), (Haffajee et al. 2008) angewendet. Diese weist meist 40 Spezies nach. Modernere Verfahren stellen die quantitative 16S rDNA Klonierung und Sequenzierung (Kumar et al. 2006) sowie Mikroarrays (Colombo et al. 2009) dar. Alle vorgenannten Methoden sind nützlich zur Darstellung der mit der parodontalen Erkrankung in Zusammenhang stehenden Keimprofile. Die Vielzahl der nachgewiesenen Spezies in ihrer Zusammensetzung lässt sich aber nur begrenzt für Diagnostik, Therapieempfehlung und -kontrolle eines einzelnen Patienten nutzen. Um die Erkrankung eines Patienten zu charakterisieren, scheint eine quantitative Erfassung der bekannten parodontopathogenen Mikroorganismen hilfreich. In klinischen Studien wird auf der Grundlage des Nachweises von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T.*

denticola etc. die Therapie festgelegt (Christodoulides et al. 2008, Guentsch et al. 2008). Mikrobiologische Diagnostik, basierend auf dem Nachweis dieser Spezies, ermöglicht eine Voraussage über die Nachhaltigkeit des Reattachments (Nieminen et. al 1996).

In zurückliegenden Studien wurden bereits verschiedene nukleinsäurebasierte Nachweismethoden mit der Kultur verglichen. Im Allgemeinen zeigten die nukleinsäurebasierten Methoden eine höhere Prävalenz der relevanten Keime (Jervoe-Storm et al. 2005, Verner et al. 2006). Jervoe-Storm et al. verglichen die Real time-PCR mit der Kultur als Referenzmethode und kamen insbesondere bei *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *T. forsythia* auf Korrelationswerte nach Spearman von 0,82 (*A. actinomycetemcomitans*), 0,83 (*P. gingivalis*), bzw. 0,67 (*T. forsythia*) zwischen den verglichenen Verfahren (Jervoe-Storm et al. 2005). Die Sensitivität eines nukleinsäurebasierten Verfahrens kann durch das Vorhandensein verschiedener Moleküle wie Hämoglobin, Lactoferrin, Immunglobulin G und Kollagen beeinträchtigt sein (Radstrom et al. 2004) Diese Moleküle sind reichlich in parodontalen Taschen vorhanden (Jentsch et al. 2004, Hanioka et al. 2005).

Die Real time-PCR und der microIdent®-Test korrelierten signifikant. Der Rangkorrelationskoeffizient erreichte bei dem Keim *P. gingivalis* den höchsten Wert von 0,74. Das ist ein höherer Wert, als er etwa in einer Vergleichsstudie mit 350 Proben zwischen Checkerboard und microIdent® erzielt wurde (Haffajee et al. 2009). Dort lag der höchste gemessene Rangkorrelationskoeffizient für *T. denticola* bei 0,58, in unserer Studie war dieser bei 0,62.

Ebenso ergaben sich in unserer Studie höhere Rangkorrelationskoeffizienten für *F. nucleatum* von 0,59; Haffajee et al. 2009 erreichte 0,49. Und für den Keim *E. nodatum* errechnete unsere Studie einen Korrelationswert von 0,59, Haffajee et al. 2009 erreichten hingegen nur 0,46. Damit kann die Aussage getroffen werden, dass die Werte der vorliegenden Vergleichsstudie stärker korrelieren als in der Vergleichsstudie von Haffajee et al 2009.

In unserer Studie wurde dieselbe DNA für zwei Techniken verwendet. Dennoch kam die Korrelation dem Wert von 1,00 nicht nahe. Jene Proben, die ein im Vergleich zum microIdent®-Test nur ein schwaches Signal in allen Real time-PCRs zeigten, lassen den Schluss zu, dass Bestandteile des subgingivalen Biofilms, wie die oben erwähnten

Wirtsproteine mit SYBR Green I interagieren. Andererseits wurden in wenigen Fällen parodontogene Bakterien wie *A. actinomycetemcomitans* durch den microIdent®-Test nicht nachgewiesen, wohingegen sie in großen Mengen in der Real time-PCR vorgefunden wurden. In den meisten dieser Fälle erbrachte die Untersuchung anderer Proben derselben Patienten positive Ergebnisse. Dieses legt den Schluss, dass das Problem probenspezifisch auftrat und mit der multiplexen PCR, die dem microIdent®-Test vorausgeht, zusammenhängen könnte.

*A. actinomycetemcomitans* ist auf selektivem TSBV-Agar kultivierbar. Die Übereinstimmung der Kultur mit der PCR wurde in einigen Berichten als gut beschrieben (Riggio et al. 1996, Eick und Pfister 2002). Andere beschrieben mehr Abweichungen. So fand eine Studie, die Checkerboard mit der Kultur verglich, nur 20% der mit der Kultur nachgewiesenen *A. actinomycetemcomitans* mittels Checkerboard und nur 26% der mit Checkerboard nachgewiesenen *A. actinomycetemcomitans* in der Kultur (Papapanou et al. 1997).

Wird *A. actinomycetemcomitans* in schweren Fällen aggressiver Parodontitis nachgewiesen, ist eine kombinierte Therapie, bestehend aus Antibiose und mechanischem Debridement, indiziert (Walter und Karpinia 2002). Ist der Anteil an *A. actinomycetemcomitans* schon vor der Therapie (SRP) hoch, könnte eine negative Voraussage für den Therapieerfolg getroffen werden (Fujise et al. 2002). Deshalb ist ein korrekter Nachweis dieser Spezies essentiell. Die generell gute Übereinstimmung unserer angewendeten Methoden in unserer Studie könnte einen Hinweis darauf liefern, dass beide verglichene Methoden die Spezies sicher nachweisen. In vorliegender Studie nahm der Keim *A. actinomycetemcomitans* in der Studienpopulation nach SRP zu. Deshalb sollte angemerkt werden, dass in unserer Studie Patienten mit chronischer Parodontitis analysiert wurden. Die Spezies *A. actinomycetemcomitans* wird aber eher im Zusammenhang mit aggressiver Parodontitis gesehen (Schacher et al. 2007).

Auch beim Nachweis der Bakterienspezies *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* korrelierten microIdent® und Real time-PCR gut. Bei der Spezies *P. gingivalis* betrug der Korrelationskoeffizient 0,74. So wurden von den durch die Real time-PCR positiv erkannten Proben 96% auch durch microIdent® erkannt und umgekehrt 80% der durch microIdent® positiv erkannten Proben wurden auch durch Real time-PCR detektiert.

*P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* existieren zumeist zusammen im subgingivalen Biofilm und sind in Sites mit tieferer Sondierungstiefe und hohen BOP-Werten vermehrt vorhanden (Mineoka et al. 2008). Das gemeinsame Auftreten von *P. gingivalis* und *T. forsythia* mit hohem Anteil an *P. gingivalis* (ohne *T. denticola*) findet sich jedoch häufiger in Sites mit geringerer Sondierungstiefe und weniger BOP nach SRP (Fujise et al. 2002). Die Kombination von hohen MMP-8-Spiegeln im Speichel und *T. denticola* im subgingivalen Biofilm lässt eine zuverlässige Aussage über die Schwere der parodontalen Erkrankung zu (Ramseier et al. 2009). Infolgedessen sollten diese parodontalen Schlüsselkeime in jeder mikrobiologischen Analyse der Parodontitis nachgewiesen werden.

Der Rangkorrelationskoeffizient zwischen den beiden nukleinsäurebasierten Methoden betrug bei allen Spezies außer bei den *Capnocytophaga* spezies  $>0,5$ . Neben den bereits erwähnten Spezies sind *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens* wie auch *F. nucleatum*, *P. intermedia* und *P. micra* (Edwardson et al. 1999) mit klinisch manifester Parodontitis assoziiert (Rams et al. 1996, Edwardsson et al. 1999, Booth et al. 2004, Haffajee et al. 2009). Bei den mit Real time-PCR analysierten Proben ließen sich keine niedrigeren Werte an *Capnocytophaga* sp. nach der Therapie nachweisen. Die Betrachtung der einzelnen Spezies ergab, dass dieses Ergebnis aus der unveränderten Menge an *C. sputigena* resultierte. In anderen Studien fanden sich im subgingivalen Biofilm ebenso größere Mengen an *C. sputigena* verglichen mit *C. gingivalis* (Salari und Kadkhoda 2004). Der microIdent®-Test nutzt für *Capnocytophaga* sp. eine gemischte Gensonde, die für *C. gingivalis* sensibler sein könnte. Somit erscheint für die mikrobiologischen Analyse der Parodontitis eine Einzelanalyse von *F. nucleatum* und *C. gingivalis* als Vertreter von Fusobakterien und Capnocytophagen im Vergleich zu dem gemischten Nachweis als sinnvoll.

Beim microIdent®-Test bewegten sich die positiven Proben zwischen 13,6% für *E. nodatum* und 93,8% bei *F. nucleatum/periodonticum*. Meistens war nach der Therapie eine deutliche Abnahme der Keimzahlen zu beobachten.

Da geringe Mengen parodontopathogener Keime auch bei parodontal Gesunden gefunden wurden (Lau et al. 2004, Mineoka et al. 2008), ist die Anwendung eines Schwellenwertes hilfreich. Entsprechend ihrer Relevanz beträgt er beim microIdent®-Test  $10^3$  für *A. actinomycetemcomitans* und  $10^4$  für alle anderen im Kit vertretenen Spezies. Beide Methoden wiesen nach der Therapie eine veränderte Keimzahl nach. Teilweise wurde dieser Unterschied beim microIdent®-Test deutlicher sichtbar, was aus dem Schwellenwert und der

semiquantitativen Analyse resultieren könnte. Diese Semiquantifizierung könnte kleinere Therapieerfolge maskieren. Zudem beruhen beide Verfahren auf einer 16S rDNA, bei der die exakte Bestimmung der Keimzahl ohnehin nicht möglich ist, weil jede Bakterienzelle eine variable Menge des Moleküls enthält, so dass in einigen Fällen auf Single Gen basierende Primer zu empfehlen wären (Morillo et al. 2003).

Die In house Real time-PCR stellt eine kostengünstige und nützliche Methode für großangelegte Studien dar. Die semiquantitative Strip Technologie kann für die Diagnose, Therapieplanung- und Kontrolle in der zahnärztlichen Praxis und in klinischen Versuchen empfohlen werden. Bei automatischer quantitativer Auswertung könnte auch der microIdent®-Test sich für die Anwendung in großen klinisch-mikrobiologischen Studien eignen. Trotzdem sollte zusammenfassend angemerkt werden, dass aufgrund der großen Komplexität der Mikroflora und der Wirtsproteine in der subgingivalen Region jede nukleinsäurebasierte Methode nicht eine Sensitivität und Spezifität von 100% erreicht.

Die vorliegende Studie zeigt, dass in erfolgreich behandelten Taschen *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, ebenso wie *P. micra* und *C. rectus* nach drei Monaten weniger stark vertreten sind als zuvor und unterstreicht die Bedeutung der mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontitistherapie. Dieses Ergebnis findet sich in Übereinstimmung mit anderen Therapiestudien. Zunächst wird häufig ein initialer Abfall der Zahlen der parodontopathogenen Bakterien erreicht, der sich allerdings im weiteren Verlauf nur in der Gruppe mit klinischem Behandlungserfolg als stabil erweist (Guentsch et al., 2008; Yashima et al., 2009).

Obgleich Pihlstrom in seiner Arbeit von 2001 eine mikrobiologische Untersuchung für die Mehrzahl der von parodontalen Erkrankungen betroffenen Patienten nicht für angezeigt hält, empfiehlt er diese in bestimmten Fällen diese Analyse. In diesen Fällen kann die mikrobiologische Diagnostik dem Zahnarzt Hinweise auf die mikrobielle Mitbedingtheit der Erkrankung und die daraus abzuleitende Therapie geben (Pihlstrom 2001).

Die semiquantitative DNA STRIP-Technik kann für die Diagnose, die Behandlungsplanung und Erfolgskontrolle in der zahnärztlichen Praxis und auch in klinischen Studien empfohlen werden. Zur Prognose des Therapieerfolgs erscheint eine mikrobiologische Untersuchung drei Monate nach der Behandlung sinnvoll.



## **7. Schlussfolgerungen**

Die mikrobiologische Analyse erweist sich bei Diagnostik, Therapieplanung und -kontrolle von schweren Fällen der chronischen Parodontitis als hilfreich. Hierbei sind semiquantitative Aussagen zum Vorkommen parodontaler Schlüsselkeime ausreichend. Eine mikrobiologische Analyse drei Monate nach erfolgter systematischer Therapie kann Hinweise auf den späteren Therapieerfolg liefern.

Für die mikrobiologische Diagnostik stellen nukleinsäurebasierte Verfahren das Mittel der Wahl dar. Eine evaluierte In house Real time-PCR eignet sich dafür ebenso wie der auf DNA-Streifen-Technologie basierende microIdent®-Test. Die In house Real time-PCR ist eine kostengünstige Methode zur Anwendung in großen Studien. Sie ist allerdings störanfällig gegenüber äußeren Einflüssen; deshalb ist eine Doppelbestimmung angezeigt. Die semiquantitative DNA-Streifen-Technologie hingegen empfiehlt sich für den Einsatz bei kleinerem Probenaufkommen, also in der zahnärztlichen Therapie und im Rahmen kleinerer klinischer Studien. Bei Vorhandensein einer automatischen quantitativen Auswertung erscheint dieser Test auch für große klinische Studien geeignet.

## Literaturverzeichnis

1. American Academy of Periodontology-Research, Science and Therapy Committee. Periodontal diseases of children and adolescents. *Pediatr Dent* 2008-2009; 30 (Suppl 7): 240-247
2. Andrian E, Mostefaoui Y, Rouabhia M, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model. *J Cell Physiol* 2007; 211: 56-62
3. Antony B, Thomas S, Chandrashekar SC, Kumar MS, Kumar V. Osteomyelitis of the mandible due to *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52:115-116
4. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6
5. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11:266-273
6. Bartold PM, Wiebkin OW, Thonard JC. The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Periodontol Res* 1984; 19: 390-400
7. Beikler T, Flemmig TF, Karch H. Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK) und der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) 2003
8. Bodet C, Chandad F, Grenier D. Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55:154-162
9. Booth V, Downes J, Van den Berg J, Wade WG. Gram-positive anaerobic bacilli in human periodontal disease. *J Periodontol Res* 2004; 39:213-220.
10. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2007; 78:79-86.
11. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Comparison of Real time-PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4950-4954

12. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and Real time-PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45:191-199
13. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of Real time-PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2006; 33:427-433
14. Callan DP, Cobb CM, Williams KB. DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study. *J Periodontol* 2005; 76:115-120
15. Cheeseman SL, Hiom SJ, Weightman AJ, Wade WG. Phylogeny of oral asaccharolytic Eubacterium species determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison and proposal of Eubacterium infirmum sp. nov. and Eubacterium tardum sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:957-959.
16. Christodoulides N, Nikolidakis D, Chondros P, Becker J, Schwarz F, Rossler R, Sculean A. Photodynamic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol* 2008; 79:1638-1644.
17. Ciantar M, Gilthorpe MS, Hurel SJ, Newman HN, Wilson M, Spratt DA. Capnocytophaga spp. in periodontitis patients manifesting diabetes mellitus. *J Periodontol* 2005; 76:194-203
18. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 9 (Suppl 8):1569-1576
19. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009; 80:1421-1432.
20. Conrads G. Molekularbiologische Verfahren in der Anaerobier -, speziell Parodontitiserreger-Diagnostik. *Mikrobiologie* 1999; 9:165-169
21. Cosgarea R, Bäumer A, Zehaczek S, Kim TS. Comparison of two different microbiological testkits for detection of periodontal pathogens, *Acta Odont Scan* 2009, SODE-2009-0101: 2-29
22. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, Reynolds EC, Aduse-Opoku J. Molecular genetics and nomenclature of proteases of Porphyromonas gingivalis. *J Periodontal Res* 1999; 34:464-472

23. Di Murro C, Paolantonio M, Pedrazzoli V, Lopatin DE, Cattabriga M. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Treponema denticola* in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J Periodontol* 1997; 68:18-23
24. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999; 26:143-152.
25. Ehmke B, Moter A, Beikler T, Milian E, Flemmig TF. Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. *J Periodontol* 2005; 76:749-759
26. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2002; 29:638-644.
27. Eickholz P, Kugel B, Pohl S, Näher H, Staehle HJ. Combined mechanical and antibiotic periodontal therapy in a case of Papillon-Lefèvre syndrome. *J Periodontol* 2001; 72:542-549
28. Fenno JC. Laboratory maintenance of *Treponema denticola*. *Curr Protoc Microbiol* 2005; 12:Unit 12B.1
29. Fernyhough W, Page RC. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. *J Periodontol* 1983; 54:133-140
30. Fives-Taylor PM, Meyer DH, Mintz KP, Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000; 20:136-167.
31. Fives-Taylor PM. Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14:109-116
32. Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, Bird PS, West MJ, Cullinan MP, Seymour GJ. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:206-211
33. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40:3223-3231
34. Fujise O, Hamachi T, Inoue K, Miura M, Maeda K. Microbiological markers for prediction and assessment of treatment outcome following non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol* 2002; 73:1253-1259.

35. Gängler P, Arnold WH. Gingivitis, Histopathologie - Stagnation und Progression. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie, 2.Auflage, Thieme Verlag Stuttgart 2005; 271
36. Grenier D, Grignon L. Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum* ssp. *nucleatum* lipopolysaccharide. Oral Microbiol Immunol 2006; 21:190-196
37. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. J Clin Microbiol 1998; 36:3239-3242
38. Guentsch A, Jentsch H, Pfister W, Hoffmann T, Eick S. Moxifloxacin as an adjunctive antibiotic in the treatment of severe chronic periodontitis. J Periodontol 2008; 79:1894-1903.
39. Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, Eick S. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Periodontal Res 2009, [Epub ahead of print]
40. Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Garcés CP, Román-Alvárez P, Barajas-Torres C, Contreras-Marmolejo LA. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* adheres to human gingival fibroblasts and modifies cytoskeletal organization. Cell Biol Int 2007; 31:1063-1068
41. Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2008; 23:148-157.
42. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol 2006; (5):269-282
43. Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2009; 36:642-649
44. Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2009; 36:642-649.

45. Hagiwara S, Iida M, Ishikawa I. Clinical and microbiological study concerning effects of scaling and root planing. 2. The effects of mechanical debridement until one year and of minocycline application topically. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 1993; 60:301-312
46. Hain Lifescience GmbH, Nehren, (<http://www.hain-lifescience.de/technologie/dnastrip.html>)
47. Hanioka T, Matsuse R, Shigemoto Y, Ojima M, Shizukuishi S. Relationship between periodontal disease status and combination of biochemical assays of gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 2005; 40:331-338.
48. Hayashi F, Okada M, Zhong X, Miura K. PCR detection of *Capnocytophaga* species in dental plaque samples from children aged 2 to 12 years. *Microbiol Immunol* 2001; 45:17-22.
49. Hill GB, Ayers OM, Kohan AP. Characteristics and sites of infection of *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy*, and other asaccharolytic eubacteria. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1540-1545
50. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000; 20:168-238
51. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 2007; Band 37, Nr.2:120-126 (nach: [http://de.Wikipedia.org/wiki/Real\\_time\\_quantitative\\_PCR](http://de.Wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR))
52. Horn, F et. al. Das Prinzip der PCR. *Biochemie des Menschen*; 2. korrigierte Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2003; S.303
53. Ihara H, Miura T, Kato T, Ishihara K, Nakagawa T, Yamada S, Okuda K. Detection of *Campylobacter rectus* in periodontitis sites by monoclonal antibodies. *J Periodontal Res* 2003; 38:64-72
54. Ikegami A, Chung P, Han YW. Complementation of the *fadA* mutation in *Fusobacterium nucleatum* demonstrates that the surface-exposed adhesin promotes cellular invasion and placental colonization. *Infect Immun* 2009; 77:3075-3079
55. Imamura T, Potempa J, Travis J. Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. *Biol Chem* 2004; 385:989-996
56. Jentsch H, Sievert Y, Gocke R. Lactoferrin and other markers from gingival crevicular fluid and saliva before and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 2004; 31:511-514.

57. Jervoe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. Comparison of culture and Real time-PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2005; 32:778-783.
58. Kang MS, Kim BG, Chung J, Lee HC, Oh JS. Inhibitory effect of *Weissella cibaria* isolates on the production of volatile sulphur compounds. *J Clin Periodontol* 2006; 33(3):226-232
59. Kelk P, Claesson R, Chen C, Sjöstedt A, Johansson A. IL-1 $\beta$  secretion induced by *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* is mainly caused by the leukotoxin. *Int J Med Microbiol* 2008; 298:529-541
60. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66:486-505
61. Kook JK, Kim MK, Kim HS, Cho SI, Kim SG. Microbiological findings of a periapical lesion caused by overfilling of gutta-percha cone. A case report. Unpublished Pubmed Accession 2002; AF543295
62. Kuboniwa M, Amano A, Inaba H, Hashino E, Shizukuishi S. Homotypic biofilm structure of *Porphyromonas gingivalis* is affected by FimA type variations, *Oral Microbiol Immunol* 2002; 24:260-263
63. Kumar PS, Leys EJ, Bryk JM, Martinez FJ, Moeschberger ML, Griffen AL. Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3665-3673.
64. Kunkel D, Dennis Kunkel Microscopy Inc., (<http://www.denniskunkel.com/DK/Bacteria/27326D.html>)
65. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004; 31:1061-1069.
66. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 2004; 31:1061-1069

67. Liu PF, Haake SK, Gallo RL, Huang CM. A novel vaccine targeting *Fusobacterium nucleatum* against abscesses and halitosis. *Vaccine* 2009; 4;27:1589-1595
68. L  e H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965; 36:177-187
69. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992; 30:427-433
70. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol* 1995; 15(3):169-175
71. Meng S, Zhao L, Yang H, Wu Y, Ouyang Y. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. *Quintessence Int* 2009; 40:53-60
72. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, Takehara T. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol* 2008; 79:670-676.
73. Monefeldt K, Tollefsen T. Serum IgG antibodies reactive with lipoteichoic acid in adult patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989; 16:519-524
74. Monis PT, Giglio S, Saint CP. Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. *Anal Biochem* 2005; 340:24-34.
75. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A. Quantitative Real time-PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 2003; 38:518-524.
76. Morita M, Wang HL. Relationship of sulcular sulfide level to severity of periodontal disease and BANA test. *J Periodontol* 2004; 72:74-78
77. M  lhardt C. Real-time quantitative PCR. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2002; 94
78. Nieminen A, Asikainen S, Torkko H, Kari K, Uitto VJ, Saxen L. Value of some laboratory and clinical measurements in the treatment plan for advanced periodontitis. *J Clin Periodontol* 1996; 23:572-581.



79. Ota-Tsuzuki C, Alves Mayer MP. Collagenase production and hemolytic activity related to 16S rRNA variability among *Parvimonas micra* oral isolates. Anaerobe 2009; Apr 5. [Epub ahead of print]
80. Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan AS. Detection of *treponema denticola* in symptomatic apical periodontitis and in symptomatic apical abscesses by Real time-PCR. *Eur J Dent* 2009; 3:107-113
81. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 1997; 14:9-11
82. Page RC. Periodontal therapy: prospects for the future. *J Periodontol* 1993; 64(8 Suppl):744-753
83. Paju S, Carlson P, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Heterogeneity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains in various human infections and relationships between serotype, genotype, and antimicrobial susceptibility. *J Clin Microbiol* 2000; 38:79-84
84. Papapanou PN, Madianos PN, Dahlen G, Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur J Oral Sci* 1997; 105:389-396.
85. Pei J, Grishin NV. Prediction of a caspase-like fold in *Tannerella forsythia* virulence factor PrtH. *Cell Cycle* 2009; 1;8:1453-1455
86. Pellacchia V, Terenzi V, Moricca LM, Buonaccorsi S, Indrizzi E, Fini G. Brain abscess by mycotic and bacterial infection in a diabetic patient: clinical report and review of literature . *J Craniofac Surg* 2006; 17(3):578-584
87. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Builds Mutualistic Biofilm Communities in Saliva With *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* sp. *Infect Immun* 2009; 29. [Epub ahead of print]
88. Pfaffl, MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 2004 (nach: [http://de.Wikipedia.org/wiki/Real\\_time\\_quantitative\\_PCR](http://de.Wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR))
89. Pihlstrom B. Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning. *Periodontology* 2000 2001; 25:37-58
90. Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol* 2000; 24:153-192
91. Potempa J, Nguyen KA. Purification and characterization of gingipains. *Curr Protoc Protein Sci* 2007; Chapter 21:Unit 21.20
92. Potempa M, Potempa J, Kantyka T, Nguyen KA, Wawrzonek K, Manandhar SP, Popadiak K, Riesbeck K, Eick S, Blom AM. Interpain A, a cysteine proteinase from

- Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. PLoS Pathog 2009; Feb;5:e1000316. Epub 2009 Feb 27.
93. Potempa M, Potempa J, Okroj M, Popadiak K, Eick S, Nguyen KA, Riesbeck K, Blom AM. Binding of complement inhibitor C4b-binding protein contributes to serum resistance of *Porphyromonas gingivalis*. J Immunol 2008;181:5537-5544
  94. Pye AD, Lockhart DE, Dawson MP, Murray CA, Smith AJ. A review of dental implants and infection. J Hosp Infect 2009;72:104-110
  95. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Lovenklev M, Lofstrom C. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol 2004; 26:133-146
  96. Ramfjord SP. Maintenance care and supportive periodontal therapy. Quintessence Int 1993; 24:465-471
  97. Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. J Clin Periodontol 1996; 23:346-354.
  98. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA, Rayburn LA, Tran HM, Singh AK, Giannobile WV. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. J Periodontol 2009; 80:436-446.
  99. Riggio MP, Lennon A, Smith A. Detection of peptostreptococcus micros DNA in clinical samples by PCR. J Med Microbiol 2001; 50:249-254
  100. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. J Periodontal Res 1996; 31:496-501
  101. Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PP, Williams PH, Chapple IL. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. Oral Microbiol Immunol 2002; 17:296-303
  102. Salari MH; Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. J Oral Sci 2004; 46:157-161.
  103. Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. J Clin Periodontol 2007; 34:566-573.
  104. Siqueira JF, Rôças IN, De Uzeda M, Colombo AP, Santos KR. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. Med Microbiol 2002; 51:1090-1096

105. Sliepen I, Van Essche M, Pauwels M, Van Eldere J, Hofkens J, Quirynen M, Teughels W. Colonization of hard and soft surfaces by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* under hydrodynamic conditions. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23:498-504
106. Slots J. Update on *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Int Acad Periodontol* 1999; 1:121-126
107. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini AD, Smith C, Kent RL jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25:134-144.
108. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:352-362.
109. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002; Mar 29:260-268
110. Socransky SS, Smith C, Martin B, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994; 17:788-792.
111. Song Y, Liu C, McTeague M and Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin Microbiol* 2003; 41:1363-1369
112. Swoboda JR, Kiyak HA, Darveau R, Persson GR. Correlates of periodontal decline and biologic markers in older adults. *J Periodontol* 2008; 79:1920-1926
113. Tabeta K, Shimada Y, Tai H, Ishihara Y, Noguchi T, Soga Y, Takashiba S, Suzuki G, Kobayashi T, Oka A, Kobayashi T, Yamazaki K, Inoko H, Yoshie H. Assessment of chromosome 19 for genetic association in severe chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80:663-671
114. Takahashi N, Kobayashi M, Takaki T, Takano K, Miyata M, Okamatsu Y, Hasegawa K, Nishihara T, Yamamoto M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide stimulates collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23:259-264
115. Tonetti MS, Steffen P, Muller-Campanile V, Suvan J, Lang NP. Initial extractions and tooth loss during supportive care in a periodontal population seeking comprehensive care. *J Clin Periodontol* 2000; 27:824-831.
116. Torrungruang K, Bandhaya P, Likittanasombat K, Grittayaphong C. Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban thai adults. *J Periodontol* 2009; 80:122-129

117. Tran SD, Rudney JD. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3504-3508
118. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, Van Hove K, Mutters R, Hommez J, Dewhirst FE, Paster BJ, Kersters K, Falsen E, Devrieze L, Bisgaard M. Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov. isolated from avian respiratory tract. Unpublished Pubmed Accession 1993; L14636
119. Vandamme P, Vancanneyt M, van Belkum A, Segers P, Quint WG, Kersters K, Paster BJ, Dewhirst FE. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and Centers for Disease Control group DF-3. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:782-791
120. Veith PD, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Paolini RA, Orth R, Walsh KA, Reynolds EC. Major proteins and antigens of *Treponema denticola*. *Biochim Biophys Acta* 2009; Jun 6. [Epub ahead of print]
121. Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:341-346.
122. Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002; 73:1188-1196.
123. Wang B, Kraig E, Kolodrubetz D. Use of defined mutants to assess the role of the *Campylobacter rectus* S-layer in bacterium-epithelial cell interactions. *Infect Immun* 2000; 68:1465-1473
124. Wang Y, Goodman SD, Redfield RJ, Chen C. Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* 2002; 184:3442-3449
125. WHO (Hrsg.). *Oral Health Surveys - Basic Methods*, 4th Ed., 1997
126. Wikipedia ([http://de.wikipedia.org/wiki/Real\\_time\\_quantitative\\_PCR](http://de.wikipedia.org/wiki/Real_time_quantitative_PCR)).
127. Yang HW, Asikainen S, Doğan B, Suda R, Lai CH. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 2004; 75:592-599
128. Yang HW, Huang YF, Chan Y, Chou MY. Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to periodontal condition: prevalence and proportions in subgingival plaque. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:28-33

129. Yashima A, Gomi K, Maeda N, Arai T. One-stage full-mouth versus partial-mouth scaling and root planing during the effective half-life of systemically administered azithromycin. *J Periodontol.* 2009; 80(9):1406-1413

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Biofilm auf der Zahnoberfläche nach Kolenbrander et al. 2002
- Abb. 2: Pathogenese der Parodontitis nach Page u. Kornman (1997)
- Abb. 3: Kolonie von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf TSBV-Agar
- Abb. 4: Ausschnitt aus micro-IDent®-Auswertungsbogen mit angelegter Schablone
- Abb. 5: Während der PCR aufgezeichnetes Fluoreszenzsignal und anschließende Schmelzkurve des Produktes
- Abb. 6: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- Abb. 7: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent® für den Keim *Porphyromonas gingivalis*
- Abb. 8: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real-time und microIdent® für den Keim *Prevotella intermedia*
- Abb. 9: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real-time und microIdent® für den Keim *Tannerella forsythia*
- Abb. 10: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real-time und microIdent® für den Keim *Treponema denticola*
- Abb. 11: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Parvimonas micra*
- Abb. 12: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Fusobacterium nucleatum*
- Abb. 13: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Campylobacter rectus*
- Abb. 14: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Eikenella corrodens*
- Abb. 15: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für den Keim *Eubacterium nodatum*
- Abb. 16: Korrelation zwischen den Nachweismethoden Real time-PCR und microIdent®plus für die Keime *Capnocytophaga species*
- Abb. 17: Keimbelastung mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

- Abb. 18: Keimbelastung mit *Porphyromonas gingivalis* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 19: Keimbelastung mit *Prevotella intermedia* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 20: Keimbelastung mit *Tannerella forsythia* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 21: Keimbelastung mit *Treponema denticola* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 22: Keimbelastung mit *Parvimonas micra* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 23: Keimbelastung mit *Fusobacterium nucleatum* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 24: Keimbelastung mit *Campylobacter rectus* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 25: Keimbelastung mit *Eikenella corrodens* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 26: Keimbelastung mit *Eubacterium nodatum* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP
- Abb. 27: Keimbelastung mit *Capnocytophaga species* in Sites mit und ohne Therapieerfolg vor (t1), 3 Monate (t2), 6 Monate (t3) und 12 Monate (t4) nach SRP

## **Danksagung**

Ich bedanke ich mich herzlich bei meinen wundervollen Betreuern Frau Privatdozentin Dr. med. dent. habil. Sigrun Eick und Herrn Professor Dr. med. habil. Wolfgang Pfister, die mir in jeder Phase der Dissertation geduldig beigestanden haben.

Außerdem bedanke ich mich bei Frau Claudia Ranke, MTA im Forschungsbereich „Orale Mikrobiologie“ des Institutes für Medizinische Mikrobiologie für die hervorragende Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Für sprachliche Korrekturen, Lektoratsarbeit und Fragen des Stils bin ich Herrn Privatdozent Dr. med. dent. habil. Udo Langbein, Frau Dr. med. Renate Straube und Herrn Guido Bunselmeier zu tiefem Dank verpflichtet.

Diese Studie wurde von der Hain Lifescience GmbH Nehren, Deutschland unterstützt. Die Autorin erklärt hiermit, dass sie keinen Interessenkonflikt hat.



## **Lebenslauf**

Anna Straube, geboren am 19.03.1977 in Rostock

## **Schulbildung**

Grundschule John-Brinckman, Rostock	1983-1990
Gymnasium am Goetheplatz, Rostock	1990-1993
Auslandsjahr in Schweden, Bromma Högländskolan , Stockholm	1993/94
Gymnasium an Anger, Jena	1994-1996
Abitur am Gymnasium am Anger	1996

## **Studium und Ausbildung**

Freiwilliges Soziales Jahr in der Universitätsaugenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena	1997
Studium der Humanmedizin an der FSU Jena	1998-2000
Ausbildung zum Staatl. geprüften Internationalen Tourismusassistenten an der Höheren Berufsfachschule für Tourismus, Jena	2000-2002
Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena	2002-2008
Staatsexamen im Fach Zahnmedizin	Dezember 2008
Seit Oktober 2009 als Vorbereitungsassistentin in zahnärztlicher Praxis tätig	

## **Promotion**

laufende Promotion zum Thema:

„Vergleich der Real time-PCR Methode mit der DNA STRIP-Technologie zum Nachweis parodontopathogener Bakterienspezies“

am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. M. Pfister und Frau PD Dr. med. S. Eick

Teilnahme am Kongress Europerio 6, Stockholm im Juni 2009  
Posterbeiträge:

„Semi-quantitative DNA STRIP technology in evaluation of treatment of periodontitis“

„Comparison of real-time PCR and DNA STRIP technology in detection of periodontopathogens“

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. S. Eick, Prof. Dr. W. Pfister, PD Dr. U. Langbein, MTA C. Ranke, Dr. R. Straube, G. Bunselmeier,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bern, den 29. Juni 2010